



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Olalla  
Figueroa Silva

Tesis doctoral

Valoración de la Densidad de  
Breslow como nuevo factor  
pronóstico en melanoma

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Investigación Clínica en Medicina





TESIS DE DOCTORADO

# **Valoración de la Densidad de Breslow como nuevo factor pronóstico en melanoma**

Olalla Figueroa Silva

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022





Dña. Olalla Figueroa Silva

Título de la tesis: Valoración de la Densidad de Breslow como nuevo factor pronóstico en melanoma

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, a 22 de abril de 2022

Olalla Figueroa Silva





## **AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES Y TUTOR DE LA TESIS**

### **Valoración de la Densidad de Breslow como nuevo factor pronóstico en melanoma**

D. Manuel Pereiro Ferreirós  
D. José Manuel Suárez Peñaranda  
D<sup>a</sup>. María Dolores Sánchez-Aguilar y Rojas

#### INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D<sup>a</sup>. Olalla Figueroa Silva, bajo nuestra dirección y tutorización, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como tutor y directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 22 de abril de 2022

Manuel Pereiro Ferreirós  
(Tutor)



José Manuel Suárez Peñaranda  
(Director)

María Dolores Sánchez-Aguilar y  
Rojas  
(Directora)



## CONFLICTO DE INTERESES

La doctoranda Olalla Figueroa Silva declara no tener ningún conflicto de intereses en relación con esta tesis de doctorado titulada:

### **Valoración de la Densidad de Breslow como nuevo factor pronóstico en melanoma**

Olalla Figueroa Silva





“No importa que los sueños sean mentira,  
ya que al cabo es verdad  
que es venturoso el que soñando muere,  
infeliz el que vive sin soñar”

Rosalía de Castro (1884)

“En las orillas del Sar”



## AGRADECIMIENTOS

A mi director, José Manuel Peñaranda, por ser mi guía todos estos años y por las horas dedicadas sin esperar nada a cambio. También por hacerme confiar y seguir adelante.

A mi directora, María Dolores Sánchez-Aguilar, por introducirme en la consulta de melanoma y transmitirme aspectos de la dermatología que van más allá de lo académico, pero son tan o más importantes.

A mi tutor, Manuel Pereiro, por su amabilidad y familiaridad, por darme tanto.

A Lucas Pastur, por su tiempo y paciencia. Por abrirme los ojos hacia un mundo desconocido, transmitiéndome su ilusión. A Vanesa Balboa, por su impecable trabajo a nivel estadístico.

A todos los miembros de Anatomía Patológica que han colaborado en este trabajo, especialmente a Elena Couso.

A mis compañeros de Derma, muchos de ellos amigos, que me han acompañado en esta travesía de la tesis mostrándome su apoyo. A mi jefa, Cristina, por hacer equipo y facilitar siempre.

A mis padres, porque si estoy donde estoy es gracias a ellos, por los valores que me han transmitido desde la infancia. Gracias por mostrarme que con el trabajo y la constancia y, sobre todo, el amor, todo estaba a mi alcance.

A mi hermano, mis abuelos y al resto de mi familia y amigos, por estar ahí, siempre.

A mi compañero de vida, mi todo.

A mi hija Alicia y futura, por enseñarme lo mejor de la vida.



## ÍNDICE GENERAL

<b>1. ABREVIATURAS</b> .....	<b>21</b>
<b>2. RESUMEN</b> .....	<b>23</b>
2.1. Resumen: Valoración de la Densidad de Breslow como nuevo factor pronóstico en melanoma.....	23
2.2. Resumo: Valoración da Densidade de Breslow como novo factor pronóstico en melanoma.....	24
2.3. Abstract: Assessment of Breslow Density as a new prognostic factor in melanoma	25
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>27</b>
3.1. El melanoma .....	27
3.2. Perspectiva histórica .....	27
3.3. Epidemiología.....	27
3.4. Patogénesis.....	29
3.5. Diagnóstico .....	31
3.5.1. Diagnóstico clínico.....	31
3.5.2. Dermatoscopia y dermatoscopia digital .....	32
3.5.3. Diagnóstico histológico.....	32
3.6. Clasificación clínico-patológica.....	33
3.7. Clasificación integradora: genética y morfológica .....	35
3.8. Factores pronóstico .....	36
3.8.1. Factores pronóstico clínicos .....	36
3.8.2. Factores pronóstico histológicos .....	37
3.8.3. Factores pronóstico genético-moleculares .....	43
3.9. Inteligencia artificial aplicada al ámbito médico .....	46
3.9.1. Inteligencia artificial en Oncología cutánea.....	48
3.9.2. Inteligencia artificial para predecir la mutación de BRAF .....	48
<b>4. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</b> .....	<b>51</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
5.1. Objetivo principal .....	53

5.2. Objetivos secundarios.....	53
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
6.1. Diseño del estudio .....	55
6.2. Población de estudio.....	55
6.3. Recogida de datos.....	55
6.4. Aspectos ético-legales .....	55
6.5. Descripción de las variables .....	56
6.5.1. Variable primaria.....	56
6.5.2. Variables secundarias .....	58
6.6. Genotipado .....	59
6.6.1. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección de la mutación en el gen de BRAF.....	59
6.6.2. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección de otras mutaciones en el gen BRAF y NRAS .....	59
6.7. Análisis de los datos .....	60
6.7.1. Análisis estadístico .....	60
6.7.2. Inteligencia artificial.....	60
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
7.1. Características generales de la muestra .....	63
7.2. Densidad de Breslow como nuevo factor pronóstico en melanoma. ....	65
7.3. Curvas ROC: índice de Breslow y Densidad de Breslow .....	74
7.4. Mutación de BRAF y características clínico-patológicas de los melanomas.....	76
7.5. Estimar la mutación de BRAF a partir de técnicas de inteligencia artificial .....	79
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
8.1. Características generales de la muestra .....	83
8.2. Relación entre la Densidad de Breslow y las características de los melanomas.....	84
8.3. Densidad de Breslow y estudios de supervivencia.....	85
8.4. Curvas ROC: índice de Breslow y Densidad de Breslow .....	87
8.5. Relación entre la presencia de la mutación de BRAF y las características de los melanomas.....	87
8.6. Relación entre la presencia de la mutación de BRAF y la Densidad de Breslow .....	90
8.7. Inteligencia artificial. Construcción de un árbol de decisión para predecir la mutación de BRAF.....	90
8.8. Limitaciones .....	92
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>

<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>107</b>
Anexo I. Dictamen del Comité de Ética de Investigación de Santiago-Lugo .....	107
Anexo II. Clasificación integradora basada en la Organización Mundial de la Salud .....	108
Anexo III. Clasificación TNM por estadios de la 8ª edición del <i>American Joint Committee on Cancer</i> .....	109
Anexo IV. Grupos de estadio pronósticos clínicos (cTNM) de la 8ª edición del <i>American Joint Committee on Cancer</i> .....	111
Anexo V. Grupos de estadio pronósticos patológicos (pTNM) de la 8ª edición del <i>American Joint Committee on Cancer</i> .....	111
Anexo VI. Tabla resumen sobre aproximaciones al volumen tumoral en melanoma .....	112
Anexo VII. Publicaciones derivadas.....	114



## ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Parámetros clínicos e histopatológicos incluidos para la construcción del árbol de decisión.....	61
Tabla 2. Análisis descriptivo global .....	63
Tabla 3. Comparativa de las características clínico-patológicas entre melanomas con Densidad de Breslow <65 % y ≥65 %.....	64
Tabla 4. Comparativa pronóstica según la Densidad de Breslow .....	65
Tabla 5. Probabilidades de supervivencia .....	66
Tabla 6. Análisis univariado de la influencia de los factores clínico-patológicos en la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia específica del melanoma y la supervivencia libre de metástasis utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox.....	71
Tabla 7. Análisis multivariado de riesgos proporcionales de Cox en relación con la supervivencia .....	73
Tabla 8. Probabilidades de supervivencia estimadas con el índice de Breslow y con la Densidad de Breslow .....	74
Tabla 9. Probabilidades de supervivencia estimadas con el índice de Breslow y con el modelo estimado combinado .....	75
Tabla 10. Comparativa de las características clínico-patológicas entre melanomas de tipo nativo y melanomas con mutación BRAF V600E .....	76
Tabla 11. Algoritmos de <i>Machine Learning</i> seleccionados y valores obtenidos para cada uno de ellos.....	79



## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Nuevos casos estimados de cáncer para 2022.....	28
Figura 2. Tasas de mortalidad ajustadas por edad en EEUU.....	29
Figura 3. Imágenes clínicas y dermatoscópicas de los 4 subtipos de melanoma según la Organización Mundial de la Salud .....	34
Figura 4. Imágenes histológicas de los 4 subtipos de melanoma según la Organización Mundial de la Salud .....	34
Figura 5. Diagrama de Venn.....	47
Figura 6. Esquema de la medición de la Densidad de Breslow.....	57
Figura 7. Casos de melanomas en los que se ha medido la Densidad de Breslow.....	57
Figura 8. Supervivencia global.....	67
Figura 9. Supervivencia global estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 %.....	67
Figura 10. Supervivencia libre de enfermedad.....	68
Figura 11. Supervivencia libre de enfermedad estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 %.....	68
Figura 12. Supervivencia específica de melanoma .....	69
Figura 13. Supervivencia específica de melanoma estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 % .....	69
Figura 14. Supervivencia libre de metástasis .....	70
Figura 15. Supervivencia libre de metástasis estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 %.....	70
Figura 16. Curva ROC comparativa entre índice de Breslow y Densidad de Breslow .....	74
Figura 17. Curva ROC comparativa entre índice de Breslow y modelo .....	75

Figura 18. Comparación de las curvas ROC para los 3 algoritmos .....	79
Figura 19. Importancia de las variables según el modelo XGBoost .....	80
Figura 20. Explicaciones aditivas de SHapley .....	81
Figura 21. Árbol de decisión propuesto para estimar la presencia de la mutación de BRAF V600E .....	82

Nota índice: las figuras 3 a 7 son de elaboración propia por la autora.

## 1. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATC	Área tumoral calculada
AUC	<i>Area under the curve</i> (área bajo la curva)
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSGC	Biopsia selectiva de ganglio centinela
CCI	Coefficiente de correlación intraclase
CDKN2A	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A
DB	Densidad de Breslow
DL	<i>Deep Learning</i> (aprendizaje profundo)
DSA	Daño solar acumulado
dt	Desviación típica
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
GBM	<i>Gradient Boosting Machines</i>
GEP	Perfiles de expresión génica
HE	Hematoxilina-eosina
HGC	Hibridación genómica comparada
HR	<i>Hazard ratio</i>
IA	Inteligencia artificial
IB	Índice de Breslow
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Inmunohistoquímica
IM	Índice mitótico
LightGBM	<i>Light Gradient Boosted Machine</i>
LMM	Léntigo maligno melanoma
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteínas cinasas activadas por mitógenos)

MC1R	Receptor de melanocortina 1
MES	Melanoma de extensión superficial
Micro-ARN	Micro ácidos ribonucleicos
ML	<i>Machine Learning</i> (aprendizaje automático)
MLA	Melanoma lentiginoso acral
mm	Milímetros
mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
MN	Melanoma nodular
NF1	Neurofibromina
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> (secuenciación de nueva generación)
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Redes neuronales artificiales
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SEM	Supervivencia específica de melanoma
SHAP	Explicaciones aditivas de SHAPley
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLM	Supervivencia libre de metástasis
TERT	Transcriptasa inversa de telomerasa
UV	Radiación ultravioleta
VE1	Proteína mutada BRAF V600E
XGBoost	<i>Extreme Gradient Boosting</i>

## 2. RESUMEN

### 2.1. RESUMEN: VALORACIÓN DE LA DENSIDAD DE BRESLOW COMO NUEVO FACTOR PRONÓSTICO EN MELANOMA

El melanoma es un cáncer de piel agresivo, potencialmente mortal, cuya incidencia se ha incrementado en las últimas décadas, convirtiéndolo en una de las enfermedades de mayor auge en nuestro país.

Estratificar correctamente a los pacientes según el riesgo de desarrollo de metástasis y su probabilidad de mortalidad es de vital importancia, de ahí que la identificación de nuevos factores pronóstico sea motivo de estudio constante. Actualmente, se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico molecular, pero realmente su uso en la práctica diaria es limitado: son costosos y en ocasiones poco accesibles. Por eso cobra importancia la búsqueda de nuevos factores pronóstico sensibles, específicos y fácilmente analizables, que agreguen un valor añadido a los ya conocidos y establecidos, como el índice de Breslow o la presencia de ulceración.

Por este motivo, nos gustaría resaltar el valor del análisis de la Densidad de Breslow (DB), parámetro que permite estimar el volumen tumoral, representado por el porcentaje de la dermis ocupado por células de melanoma y evaluado en la misma área tumoral en la que se mide el Índice de Breslow. Su cálculo es fácil de realizar durante el análisis histológico de rutina, y permitiría una aproximación al volumen tumoral, medida bidimensional que podría ayudar a predecir mejor el comportamiento de los melanomas. Por este motivo, hemos analizado la DB como nuevo factor pronóstico en melanoma en una cohorte de 106 pacientes.

En nuestro estudio hemos comprobado que la DB es un marcador morfológico útil y fácil de calcular, objetivando que aquellos melanomas con una densidad mayor o igual al 65% asocian características histopatológicas relacionadas con peor pronóstico, como son mayor índice de Breslow, mayor índice mitótico y presencia de ulceración. También se analizó la relación entre la DB y BRAF, aspecto no explorado previamente, comprobando que los pacientes con BRAF mutado presentan mayor DB. Resaltamos, además, que es un buen indicador de aumento de riesgo de recurrencia y los pacientes con melanomas con mayores densidades de Breslow presentan tasas de supervivencia más bajas. Incluir su análisis en la evaluación de los melanomas nos permitiría estratificar mejor a los pacientes y, aunque se necesitan más estudios, a raíz de nuestros resultados, podría proponerse un seguimiento más estrecho en los pacientes diagnosticados de melanoma con mayor densidad tumoral.

## 2.2. RESUMO: VALORACIÓN DA DENSIDADE DE BRESLOW COMO NOVO FACTOR PRONÓSTICO EN MELANOMA

O melanoma é un cancro de pel agresivo, potencialmente mortal. A súa incidencia incrementouse nas últimas décadas, pasando a ser una das enfermidades de maior auxe no noso país.

Estratificar correctamente aos pacientes segundo o risco de desenvolvemento de metástases e a súa probabilidade de mortalidade é de vital importancia, de aí que a identificación de novos factores prognóstico sexa motivo de estudo constante. Actualmente, desenvóléronse novas técnicas de diagnóstico molecular, pero realmente o seu uso na práctica diaria é limitado: son custosos e, en ocasións, pouco accesibles. Por iso cobra importancia a procura de factores prognóstico sensibles, específicos e facilmente analizables, que engadan un valor aos xa coñecidos e establecidos, como o índice de Breslow e a presenza de ulceración.

Por este motivo, gustaríanos resaltar o valor da análise da Densidade de Breslow (DB), parámetro que permite estimar o volume tumoral, representado pola porcentaxe da dermis ocupado por células de melanoma e avaliado na mesma área tumoral na que se mide o índice de Breslow. O seu cálculo é fácil de realizar durante a análise histolóxica de rutina, e permitiría unha aproximación ao volume tumoral, medida bidimensional que podería axudar a predicir mellor o comportamento das melanomas. Por este motivo, analizamos a DB como novo factor prognóstico en melanoma nunha cohorte de 106 pacientes.

No noso estudo comprobamos que a DB é un marcador morfolóxico útil e fácil de calcular, obxectivando que aqueles melanomas cunha densidade maior ou igual ao 65% asocian características histopatolóxicas relacionadas con peor prognóstico, como son maior índice de Breslow, maior índice mitótico e presenza de ulceración. Tamén se analizou a relación entre a DB e BRAF, aspecto non explorado previamente, comprobando que os pacientes con BRAF mutado presentan maior DB. Resaltamos ademais que é un bo indicador de aumento de risco de recorrencia e os pacientes con melanomas con maiores densidades de Breslow presentan taxas de supervivencia máis baixas. Incluír a súa análise na avaliación dos melanomas permitiríanos estratificar mellor aos pacientes e, aínda que se necesitan máis estudos, por mor dos nosos resultados, podería proporse un seguimento máis estreito nos pacientes diagnosticados de melanoma con maior densidade tumoral.

### 2.3. ABSTRACT: ASSESSMENT OF BRESLOW DENSITY AS A NEW PROGNOSTIC FACTOR IN MELANOMA

Melanoma is an aggressive, potentially fatal skin cancer whose incidence has increased in recent decades, making it one of the fastest growing diseases in our country.

Correct patients stratification according to their risk of developing metastases and their probability of mortality is critical, hence the identification of new prognostic factors is a matter of constant study. Currently, new molecular diagnostic techniques have been developed, but their use in daily practice is limited: they are expensive and sometimes not very accessible. For this reason, the search for new sensitive, specific and easily analysable prognostic factors that add value to those already known and established, such as the Breslow index or the presence of ulceration, is becoming increasingly important.

For this reason, we would like to highlight the value of Breslow Density (BD) analysis, a parameter that allows estimating tumour volume, represented by the percentage of the dermis occupied by melanoma cells and evaluated in the same tumour area where Breslow Index is measured. Its calculation is easy to perform during routine histological analysis, and would allow an approximation of tumoral volume, a two-dimensional measure that could help to better predict the behaviour of melanomas. For this reason, we have analysed BD as a new prognostic factor in melanoma in a cohort of 106 patients.

In our study we have proved that BD is a useful and easy to calculate morphological marker, showing that those melanomas with a density greater than or equal to 65% associate histopathological characteristics related to worse prognosis, such as higher Breslow Index, higher mitotic index and presence of ulceration. We also analysed the relationship between BD and BRAF, an aspect not previously explored, and found that patients with mutated BRAF present greater BD. We also highlight that it is a good indicator of increased risk of recurrence. Patients with melanomas with higher Breslow densities have lower survival rates. Including the calculation of BD in the evaluation of melanoma would allow us to better stratify patients. Although further studies are needed, as a result of our results, closer follow-up in patients diagnosed with melanoma with higher tumour density could be proposed.



## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1. EL MELANOMA

El melanoma es un tumor maligno originado en los melanocitos, células derivadas de la cresta neural que podemos encontrar en las mucosas, la úvea y las meninges (1). En la presente tesis nos referiremos exclusivamente al melanoma cutáneo (a partir de ahora melanoma).

Aunque poco frecuente dentro de los cánceres cutáneos, es la forma más agresiva y letal. Los avances en el conocimiento de su biología y patogénesis han permitido el desarrollo de fármacos diana que conllevan una mayor esperanza de vida para los pacientes. Pero, a día de hoy, se necesita alcanzar mayor conocimiento en la biología de los melanocitos y las alteraciones moleculares en genes y vías de señalización con el objetivo primordial de reducir la mortalidad de los pacientes diagnosticados de melanoma.

### 3.2. PERSPECTIVA HISTÓRICA

Las primeras referencias al Melanoma corresponden al siglo V a.C. con Hipócrates que lo describe como un “tumor negro fatal” (2). Pero no fue hasta el siglo XIX cuando se detallaron los principios básicos y se le reconoció como enfermedad específica. William Norris, médico general en Inglaterra, fue el primero en contribuir más claramente a la descripción del melanoma. En 1820 presentó un caso que le llevó a considerar el melanoma como hereditario y estableció unos principios básicos que se mantienen a día de hoy como la relación entre melanoma y nevos melanocíticos, melanoma y fototipos bajos; así como, la participación de factores ambientales y hereditarios. En 1838 Robert Carswell, patólogo en Londres, introdujo el término exacto de melanoma (3).

A partir de aquí, los avances en la comprensión del melanoma se han ido sucediendo. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual un melanocito progresa a melanoma sigue siendo desconocido.

### 3.3. EPIDEMIOLOGÍA

Representando una pequeña parte de los cánceres cutáneos, el melanoma es el responsable de la mayoría de muertes. En Estados Unidos ocupa el quinto lugar como cáncer más frecuente tanto en hombres como en mujeres por detrás de mama, próstata, pulmón y colon (excluyendo los cánceres de piel no melanoma) (4).

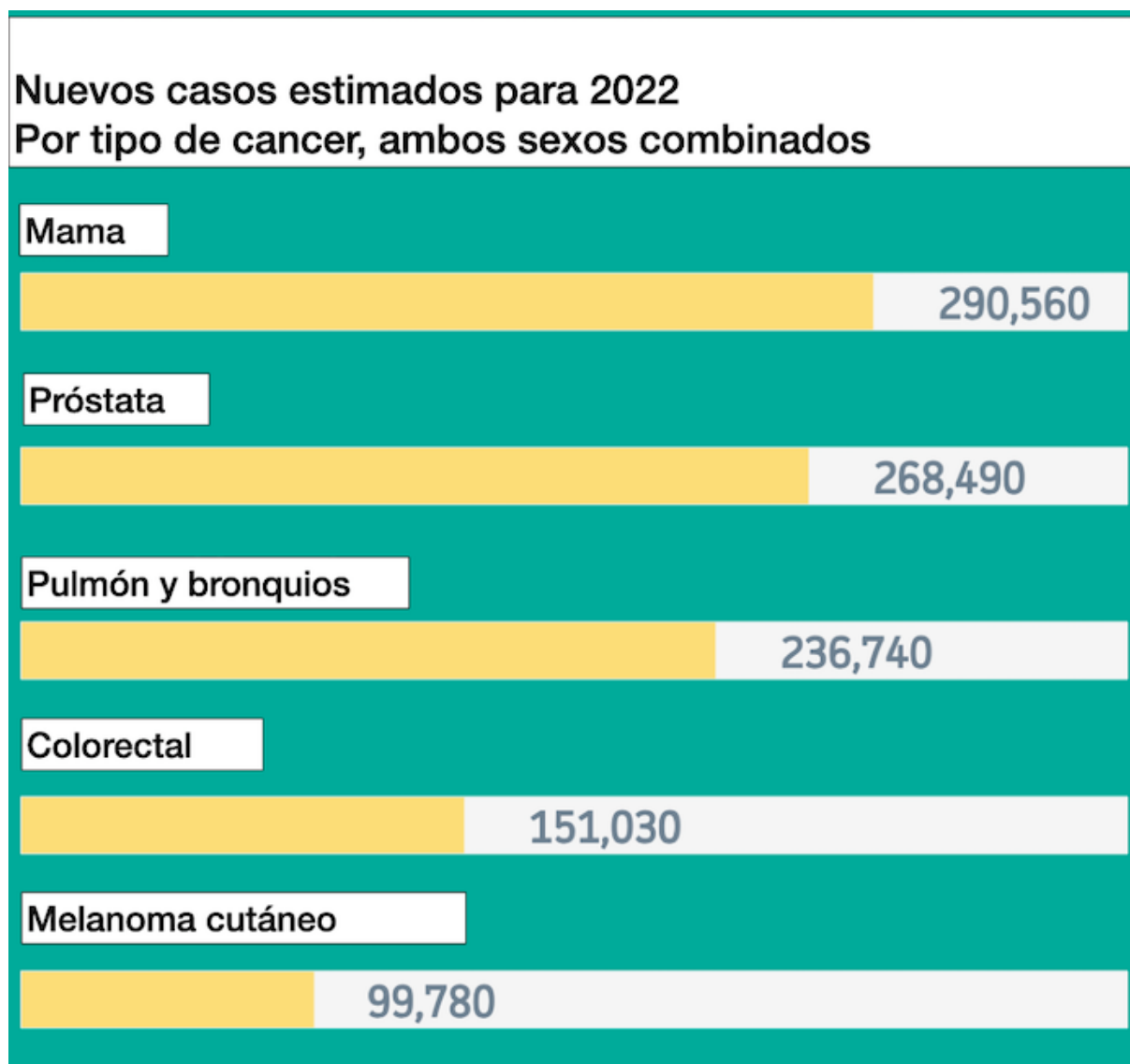


Figura 1. Nuevos casos estimados de cáncer para 2022 (ambos sexos)  
 Reproducido bajo licencia libre: Copyright © 2018 The American Cancer Society, Inc. Todos los derechos reservados

Según datos epidemiológicos actuales, su incidencia continúa en aumento ocasionando una carga económica importante para cualquier sistema de salud. A nivel global, en 2022, se estiman unos 99.780 nuevos casos de melanoma, que provocarán unas 7.650 muertes anuales (5). Pero estas tasas varían ampliamente según el país (probablemente debido a las diferencias en la incidencia de la radiación ultravioleta y las características fenotípicas poblacionales) y según el acceso disponible a la atención médica. Por ejemplo, la incidencia en Australia es de 36.6 por 100.000 personas/año y en India es de 0.29 por 100.000 personas/año (6). En España, la incidencia global cruda es de 8.82 por 100.000 personas/año, ocasionando una mortalidad de 2.17 casos por 100.000 personas/año (7).

En relación a la mortalidad, la tasa ajustada por edad fue de 2 por 100.000 personas/año, siendo más altas para los mayores de 65 años y los ancianos (Tasa ajustada de 10.8 por 100.000 personas/año según los fallecimientos de 2000-2019) (8). Cabe resaltar que se observa una tendencia hacia un descenso de la tasa de mortalidad desde 2017, que es probable esté en relación con el aumento del diagnóstico precoz y la introducción de las nuevas terapias (5).

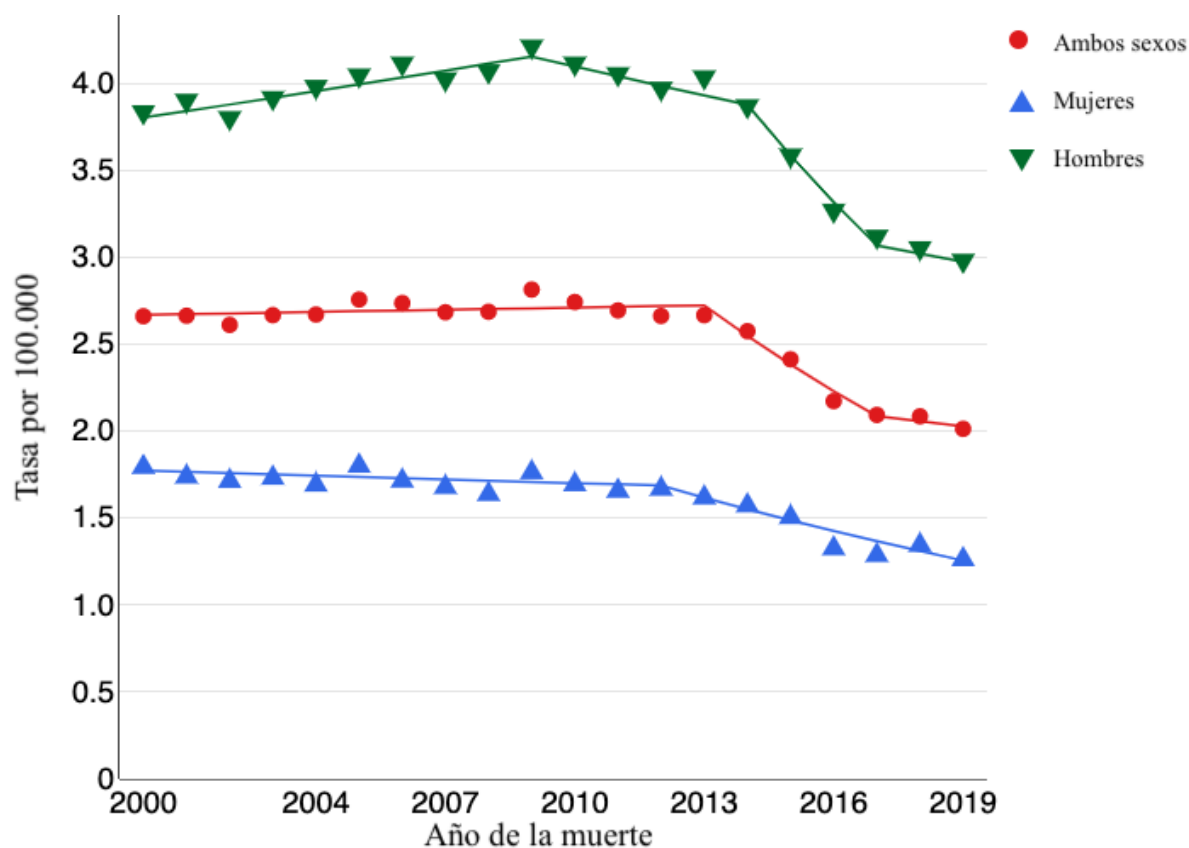


Figura 2. Tasas de mortalidad ajustadas por edad en EE.UU. (2000-2019; ambos sexos, todas las razas)  
Fuente: National Cancer Institute, SEER (8)

Centrándonos en la supervivencia, depende del estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico, disminuyendo en relación al aumento del grosor tumoral y del estadio de la enfermedad. Para un melanoma primario sin afectación ganglionar la supervivencia a 5 años es de un 99.5 %, disminuyendo a un 31.9 % si existen metástasis a distancia (8).

### 3.4. PATOGÉNESIS

Puede considerarse al melanoma una enfermedad multifactorial en la que interaccionan factores genéticos y ambientales. Nuestro fenotipo y la exposición solar recibida junto a una predisposición genética actúan como factores de susceptibilidad para desarrollar un melanoma. Un ejemplo de ello son pacientes con fototipos I y II de Fitzpatrick, con un número elevado de nevos y/o presencia de nevos atípicos y pacientes portadores de mutaciones en genes supresores de tumores, como el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A).

Aunque estos factores condicionan un aumento de riesgo de padecer melanoma, el factor principal es la exposición solar: la radiación ultravioleta (UV) altera el ácido desoxirribonucleico (ADN) celular y causa diferentes alteraciones citogenéticas. En zonas geográficas con mayor índice de radiación UV, como Australia o Nueva Zelanda, se encuentran las tasas de incidencia de melanoma más altas del mundo (6). También es importante el tipo de exposición: periodos cortos e intermitentes de exposición solar conllevan mayor peligro; al igual que las quemaduras en la infancia, momento en el que el daño carcinogénico de la radiación UV es más crítico (9). En relación al número de nevos, un metaanálisis que incluyó 10.499 casos y 14.256 controles confirmó que un elevado número de nevos comunes y la presencia de nevos atípicos son factores de riesgo para el desarrollo de melanoma. En concreto, más de 100 nevos conlleva un riesgo relativo de padecer melanoma de casi 7, frente a personas con menos de 15 nevos; asimismo, la presencia de más de 5 nevos atípicos implica un riesgo 6 veces mayor que para las personas sin ellos (10). Por todo ello, es importante identificar y definir grupos de riesgo poblacionales cuyas características nos indican quién tendrá mayor riesgo de padecer un melanoma y así realizar una vigilancia especial en estos grupos (11).

Las neoplasias melanocíticas se clasifican desde lesiones benignas, los nevos, hasta neoplasias malignas, los melanomas. Los melanocitos se sitúan en la capa basal de la epidermis y otras localizaciones como los folículos pilosos, tracto uveal del ojo, meninges y tracto anogenital. Se dividen menos de 2 veces al año y a medida que evolucionan pueden ir acumulando mutaciones puntuales y alteraciones en el número de copias. Su función es proveer de melanina a los queratinocitos, que protegerán sus núcleos de la radiación UV gracias a esta molécula (1). Las vías evolutivas de transformación maligna de los melanocitos son complejas y no se comprenden completamente. Intervienen factores exógenos, endógenos, intrínsecos del tumor y nuestro sistema inmune (12). En relación a los factores genéticos, un 85-90 % de los melanomas aparecen de forma esporádica, mientras que un 10-15 % están determinados por mutaciones heredadas o polimorfismos en genes asociados a melanomas. La tendencia actual es a clasificar los melanomas según su origen sobre piel expuesta (con daño solar acumulado [DSA]) o piel no expuesta (sin DSA) y mostrarán diferencias en relación a su localización, radiación UV acumulada, edad de aparición, carga mutacional y alteraciones oncogénicas (13–15). Esta clasificación se detallará más adelante (Ver apartado Clasificación integradora: genética y morfológica).

Las alteraciones genéticas que promoverán el desarrollo de un melanoma se producirán en genes supresores de tumores o en oncogenes. Las mutaciones más frecuentes se encuentran en vías de señalización relacionadas con proliferación (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* [BRAF], *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog* [NRAS] y neurofibromina [NF1]), crecimiento y metabolismo (PTEN y KIT), apoptosis (TP53), control del ciclo celular (CDKN2A) y replicación (transcriptasa inversa de telomerasa [TERT]). Hay genes de susceptibilidad para melanoma que son de alta penetrancia y baja prevalencia, que se asocian a una alta susceptibilidad para el desarrollo de melanoma, como ocurre con la mutación en el gen CDKN2A, presente en el 20-50 % de los casos familiares de melanoma. Este gen se localiza en el cromosoma 9p21.3 que codifica 2 proteínas (p16INK4A y p14ARF) que ejercen un control negativo en el ciclo celular, si este control negativo se pierde se producirá la progresión del ciclo celular (1). Por otra parte, existen otros genes con polimorfismos frecuentes en la población general que se expresan con baja penetrancia, como los polimorfismos en el gen del receptor de melanocortina 1 (MC1R), que estimula la producción de melanina tras la exposición a la radiación UV y participa en la reparación del daño al ADN. Dichos polimorfismos se han

asociado con el fenotipo pelirrojo, la piel clara y un aumento de riesgo bajo o moderado de melanoma. Un metaanálisis proporcionó evidencia de que hay variantes de MC1R relacionadas con el melanoma y el fenotipo, y otras solo con el desarrollo de melanoma (16). Además, la desregulación en la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es responsable de un elevado número de melanomas. Esta vía recibe estímulos externos y los transmite al núcleo celular. Una quinta parte de los tumores cutáneos contienen mutaciones en esta vía. En concreto, mutaciones en la proteína BRAF se han documentado en un 40-60 % de los melanomas y hasta en un 80 % de los nevos melanocíticos (17) y mutaciones en NRAS se han detectado en un 15-20 % de los pacientes con melanoma (18). Por último, mutaciones en c-KIT, un receptor tirosin cinasa situado en la membrana celular, descritas aproximadamente en un 6 % de los melanomas, se han visto implicadas en melanomas acrales, mucosos y localizados en áreas de exposición solar crónica (14).

### 3.5. DIAGNÓSTICO

El melanoma es un tumor biológicamente agresivo, con unas elevadas tasas de mortalidad si se diagnostica en estadios avanzados. Por el contrario, en su etapa inicial, el pronóstico es muy favorable. De ahí, la relevancia de realizar un diagnóstico precoz, que es lo que realmente tiene influencia en el pronóstico y puede minimizar la morbimortalidad.

Entre las estrategias de prevención primaria destacan las medidas de protección físicas y los fotoprotectores tópicos. A nivel de prevención secundaria resaltan la autoexploración y la evaluación de signos de alarma que se detallan a continuación. En cuanto al cribado, a día de hoy no hay consenso sobre su utilidad en población general. Si bien parece que podría tener utilidad en poblaciones de alto riesgo (19). Son también de vital importancia las campañas poblacionales de concienciación y la formación de los médicos de Atención Primaria.

#### 3.5.1. Diagnóstico clínico

El melanoma presenta una amplia variabilidad clínica, por lo que su reconocimiento en estadios precoces representa un desafío. Aunque puede desarrollarse sobre un nevo, hasta un 70 % de los casos se desarrollarán de novo (20). Para llevar a cabo el diagnóstico debemos analizar la lesión, observando sus características y podemos apoyarnos en reglas clínicas que nos ayudaran a reconocer un melanoma. Entre ellas destacan dos:

- La regla del “ABCDE”: siglas correspondientes a asimetría, bordes irregulares, color no homogéneo, diámetro >6 mm y evolución rápida. Una o más de estas características nos sugerirá el diagnóstico de melanoma. La “E” se refiere a la evolución de una lesión pigmentada en relación a cambios de tamaño, color, forma o aparición de síntomas en una lesión preexistente, es el parámetro más sensible para el diagnóstico de melanoma y reconoce la naturaleza dinámica de este tumor (21).
- La regla del “patito feo”: una lesión destaca por ser diferente al resto en el contexto fenotípico del resto de nevos del paciente (22).

A pesar de todo, existen melanomas cuyo diagnóstico supone un desafío, ya que no suelen presentar las características clásicas asociadas a melanoma, pueden simular lesiones benignas y todo ello tiene como resultado que en la mayoría de las ocasiones se diagnostican tarde. Un ejemplo de ello son los melanomas amelanóticos, los melanomas nevoideos, las lesiones rosadas, los melanomas en niños y los melanomas de la unidad ungueal (23–25).

### **3.5.2. Dermatoscopia y dermatoscopia digital**

La dermatología actual no se concibe sin el uso de un dermatoscopio, instrumento totalmente integrado en la práctica clínica diaria, sobre todo a la hora de evaluar lesiones pigmentadas. Vestergaard *et al.* (26) realizan un metaanálisis en el que confirman que el examen con dermatoscopia es más preciso que el examen a simple vista en la evaluación de las lesiones sospechosas de melanoma, con datos de sensibilidad que aumentan de 0.7 a 0.9. Además, el examen dermatoscópico ayuda a disminuir el número de biopsias y extirpación de lesiones benignas innecesarias. Carli *et al.* (27) analizaron el impacto del uso rutinario de la dermatoscopia en relación a la ratio de lesiones malignas/benignas extirpadas, obteniendo una drástica disminución (de 1:18 a 1:4.3;  $p=0.037$ ). Si almacenamos las imágenes de dermatoscopia mediante una cámara asociada a un ordenador con un software específico, nos referimos a la dermatoscopia digital. Esto se combina con la realización de fotografías de toda la superficie cutánea. Los pacientes candidatos al uso de esta técnica son aquellos que presentan alto riesgo de desarrollar un melanoma, como por ejemplo pacientes con síndrome de nevo displásico, pacientes con melanoma múltiple o pacientes portadores de la mutación CDKN2A (28).

### **3.5.3. Diagnóstico histológico**

El estudio histopatológico es fundamental para el diagnóstico de melanoma. Se tienen en cuenta criterios morfológicos a los que se les añade la información clínica. En ocasiones no es fácilmente reproducible (variabilidad interobservador, tumores melanocíticos de potencial maligno incierto...), por lo que su diagnóstico se considera un reto y ciertas lesiones pigmentadas son motivo de debate constante entre patólogos y dermatólogos.

En su inicio, el melanoma, se localiza en la epidermis donde puede ir creciendo progresivamente a lo largo de los años. Esta fase se conoce como fase de crecimiento horizontal o radial. Si diagnosticamos un melanoma en esta fase, el porcentaje de curación tras la cirugía será muy alto. En algún momento, el melanoma se expande y los melanocitos atípicos atraviesan la membrana basal, infiltrando la dermis. Esta fase se conoce como fase de crecimiento vertical, y el melanoma habrá adquirido potencial metastásico. Los criterios morfológicos para el diagnóstico de melanoma son asimetría, mala delimitación lateral, predominancia de melanocitos sueltos a nidos, dispersión intraepidérmica de melanocitos, nidos de forma, tamaño y distribución irregular, poco cohesionados, pérdida de maduración de las células en su descenso en la dermis, regresión, infiltrado inflamatorio, atipia citológica, necrosis y mitosis profundas (29). Con frecuencia se completará el estudio con tinciones de inmunohistoquímica (IHQ). Los marcadores más utilizados son S-100, HMB45 y Melan-A. La expresión de HMB-45 en todo el componente dérmico es un marcador muy específico para

melanoma. En contra, S-100 es un marcador muy sensible para proliferaciones melanocíticas, pero también tiñe células de Langerhans y otras células dendríticas. Melan-A se expresa en lesiones melanocíticas benignas y malignas, y es de ayuda en el diagnóstico de melanomas con celularidad fusiforme (30,31). Además, en ocasiones, para caracterizar un melanoma, detectar ganancias o pérdidas de función en oncogenes/genes supresores de tumores o en casos de difícil diagnóstico debe recurrirse a técnicas moleculares, como pueden ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación genómica comparada (HGC), hibridación in situ con fluorescencia (FISH), secuenciación masiva paralela y análisis de perfiles de expresión génica (GEP). Esta última se utiliza con la intención de estratificar los pacientes en categorías y así predecir la probabilidad de metástasis independientemente a variables clínico-patológicas, proporcionando información pronóstica individualizada (32). Aunque su uso rutinario no está aceptado, en casos de tumores *borderline* o de significado incierto serán un complemento diagnóstico útil.

### 3.6. CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen 4 subtipos de melanoma, que se establecen en función a las características clínico-patológicas del tumor. En orden descendente de frecuencia son: el melanoma de extensión superficial (MES), el melanoma nodular (MN), el léntigo maligno melanoma (LMM) y el melanoma lentiginoso acral (MLA) (33). El MES es más común en las piernas en las mujeres y en la espalda en los hombres. Hasta en un 33 % de los casos puede estar en asociación con un nevo preexistente. Desde el punto de vista histológico, los melanocitos atípicos se presentan aislados o en nidos en cualquier nivel de la epidermis, que se encuentra adelgazada. Las células pueden ser epitelioides o fusocelulares y su grado de atipia citológica es variable. El MN se presenta como una lesiones nodular, polipoide o pedunculada, frecuentemente ulcerada y se caracteriza por su rápido crecimiento (se presentan ya desde el inicio en fase de crecimiento vertical). Histopatológicamente se presenta como un nódulo dérmico de melanocitos atípicos e inflamación, y suele presentar una alta tasa mitótica. El LMM es frecuente en pacientes de edad avanzada, en piel con evidente daño actínico. Histopatológicamente se caracteriza por atrofia epidérmica, nidos o melanocitos solitarios dispersos en la capa basal, invasión pagetoide de la epidermis, melanocitos atípicos en la dermis que pueden extenderse a los folículos pilosos y al acrosiringio. La elastosis solar es característica. El MLA es más común en pacientes de raza negra o asiática. Asientan en la región palmoplantar y en el aparato subungueal. En el análisis histológico las crestas se presentan elongadas con melanocitos atípicos en la unión dermoepidérmica (31).



Figura 3. Imágenes clínicas y dermatoscópicas de los 4 subtipos de melanoma según la Organización Mundial de la Salud: a) melanoma nodular; b) melanoma de extensión superficial; c) melanoma lentiginoso acral; d) léntigo maligno

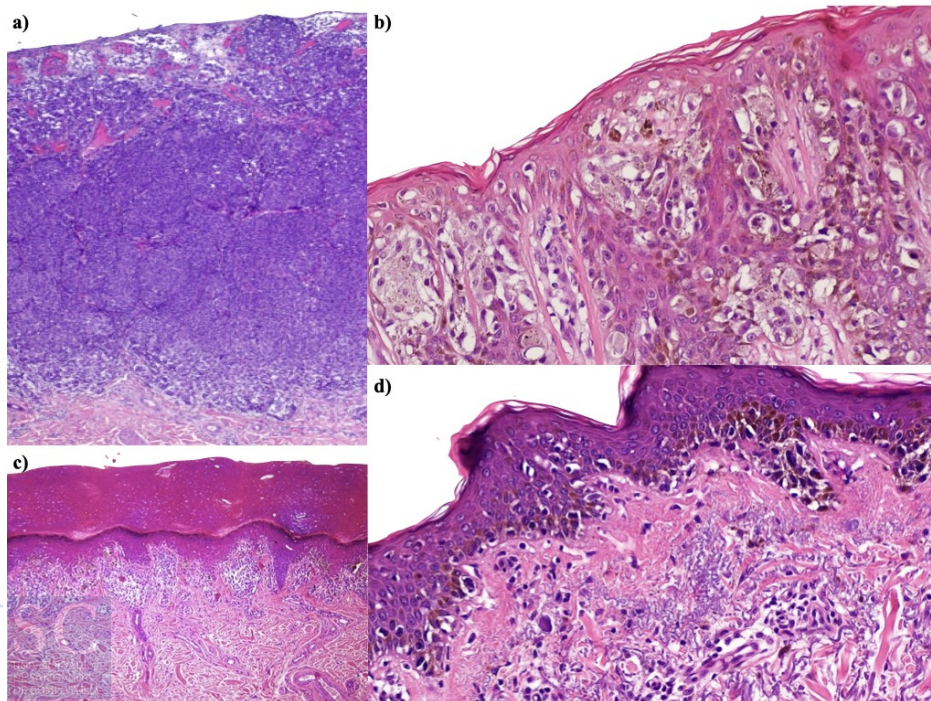


Figura 4. Imágenes histológicas de los 4 subtipos de melanoma según la Organización Mundial de la Salud: a) melanoma nodular, índice de Breslow 2.8 mm, ulcerado; b) melanoma de extensión superficial, índice de Breslow 1.1 mm, no ulcerado; c) melanoma lentiginoso acral intraepidérmico; d) léntigo maligno

Esta clasificación se basa en la propuesta original del Dr. Clark en el año 1969 (34) y desde entonces se han reconocido múltiples entidades adicionales, que no encajarían en ninguna de las categorías mencionadas previamente, como por ejemplo el melanoma nevoide o el melanoma desmoplásico (33). Otra limitación a señalar es que la localización se tiene en cuenta para subcategorizar un melanoma, pero ¿en qué circunstancias tiene más peso la clínica y en cuáles la histología? En ocasiones un MLA y un LMM solo se diferencian por la localización de los mismos. A esto se suma que las características histológicas son compartidas por diferentes tipos de melanomas, por ejemplo, el patrón lentiginoso típico del MLA y LMM puede verse en ocasiones en un MES (35,36). Aunque sin duda, la desventaja más importante sería que esta clasificación carece de impacto en el manejo de los pacientes, ya que no hay diferencias entre los subtipos de melanoma en relación a supervivencia. Esto ha sido el motor para la búsqueda y el desarrollo de nuevas clasificaciones como veremos a continuación.

### 3.7. CLASIFICACIÓN INTEGRADORA: GENÉTICA Y MORFOLÓGICA

En los últimos años, gracias a los avances en el entendimiento de la biología molecular de los melanomas, se han propuesto nuevas clasificaciones que integran alteraciones moleculares y alteraciones morfológicas con implicaciones pronósticas y terapéuticas, cuestionando la validez de la clasificación tradicional (13–15,35).

Los melanomas se inician a raíz de mutaciones de ganancia de función en genes promotores de crecimiento (por ejemplo, BRAF o NRAS). Normalmente estas mutaciones/fusiones/amplificaciones se producen en los mismos oncogenes que tendrán mutados los nevos. Las lesiones de categorías intermedias pueden tener algún cambio más relacionado con la progresión, pero insuficientes para que esa lesión sea maligna. Suelen ser casos de difícil diagnóstico tanto clínico como histológico. Posteriormente, se producirá una pérdida de función en genes supresores, por inactivación, deleciones o silenciamiento epigenético (como por ejemplo en TP53 y NF1). Todo esto seguido de la activación de genes adicionales relacionados con crecimiento y supervivencia, terminarán por desarrollar una neoplasia (13,37). Por otra parte, se observan diferencias mutacionales no solo por el momento evolutivo de la lesión, sino también por la exposición solar recibida. Así, melanomas en piel expuesta a la radiación UV con baja elastosis solar (por exposiciones intermitentes) tendrán mutado BRAF con mayor frecuencia, en contra de aquellos melanomas que aparecen en piel expuesta y además presentan una marcada elastosis solar (14,38).

En el anexo II se detalla una modificación de la clasificación propuesta por la OMS en 2018 (39) en la que se identifican 3 categorías según el grado de exposición a la radiación UV y se proponen 9 vías evolutivas distintas para el desarrollo de melanoma definidas por las alteraciones genéticas, clínicas, histológicas y epidemiológicas. De este modo se sitúa al MES como un melanoma de bajo DSA, al LMM y al melanoma desmoplásico como melanomas de alto DSA y al MLA y otras variantes (nevo de Spitz, melanoma de mucosas, melanoma sobre nevo congénito y melanoma sobre nevo azul) como melanomas de DSA bajo o nulo. El MN es analizado por separado, ya que puede surgir de múltiples vías y puede situarse en las categorías de alto y bajo DSA. Además, el melanocitoma se propone como lesiones de categoría intermedia con mayor celularidad y/o atipia, portador de mutaciones impulsoras, pero con bajo riesgo de progresión a melanoma.

Esta nueva clasificación parece mejorar en muchos aspectos a la clasificación morfológica clásica al formar subgrupos biológicamente diferentes, que comparten un mecanismo oncogénico común y se comportan de manera similar, para así poder ofrecer una aproximación pronóstica real y un tratamiento dirigido.

### **3.8. FACTORES PRONÓSTICO**

La búsqueda de nuevos factores pronóstico y modelos de predicción de supervivencia es constante, sobre todo dada la importancia de categorizar un subconjunto de pacientes, que aun perteneciendo a grupos con datos optimistas en relación a la supervivencia, desarrollarán metástasis (40). Es por esto que, además de las variables necesarias para una correcta estadificación basada en las recomendaciones del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), existen variables adicionales que es recomendable conocer y registrar, por su valor pronóstico y su utilidad de cara a decisiones en el manejo del paciente.

A continuación, se describen los principales factores pronóstico clínicos, histológicos y moleculares en el tumor primario:

#### **3.8.1. Factores pronóstico clínicos**

##### **1. Sexo**

De forma global el melanoma es más común en hombres que en mujeres. Su incidencia es similar en ambos sexos hasta los 60 años y a partir de ahí aumenta claramente en el sexo masculino (5). Los varones han mostrado sistemáticamente peor pronóstico que las mujeres (41) pero las razones de esta discrepancia no se comprenden completamente (42). Scoggins *et al.* (43) concluyeron que el sexo masculino se asocia con características tumorales desfavorables como son el aumento del grosor tumoral, la ulceración y la regresión.

##### **2. Edad**

El melanoma es excepcional en la infancia, se sitúa como el tercer tipo de cáncer más común en adolescentes y adultos jóvenes. Los melanomas en jóvenes suelen localizarse en tronco y extremidades inferiores, mientras que, a mayor edad, muestran preferencia por cabeza y cuello y extremidades superiores (44). Analizando la base de datos para la estadificación de melanoma del AJCC con 11.088 pacientes se observó que las características de los tumores en pacientes con menos de 20 años eran ligeramente más agresivas pero aún así, mostraron mejor pronóstico que otros grupos de edad (45). Por otro lado, el aumento de la edad es un factor de mal pronóstico y es a partir de los 75 años cuando se producen el mayor porcentaje de muertes por melanoma (46). Los pacientes ancianos tienen peores tasas de supervivencia que los jóvenes, debido a tumores primarios más gruesos, tasas mitóticas más elevadas y mayor presencia de ulceración (45). Las diferencias en el comportamiento y pronóstico de los melanomas en los extremos de la vida hacen plantear a diferentes autores la posibilidad de que los tumores en estos grupos de edad tengan un comportamiento biológico diferente (45,47,48).

##### **3. Localización**

La localización del tumor primario es un factor predictivo de supervivencia (49), aunque menos importante que otros factores, como el grosor tumoral o la ulceración. Los melanomas localizados en tronco y polo cefálico confieren peor pronóstico que los de las extremidades (41) pero no debería tomarse “extremidad” como una localización única, ya que se ha demostrado que los melanomas ubicados distalmente en una extremidad conllevan mayor riesgo que los de localización proximal (50). Además, los melanomas acrales suelen presentar un curso biológico más agresivo (51).

### 3.8.2. Factores pronóstico histológicos

Muchas de las variables que se describirán a continuación son necesarias para estadificar correctamente un melanoma según el AJCC y también están incluidas en el protocolo de diagnóstico histológico para el melanoma cutáneo propuesto tras el consenso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y la Academia Española de Dermatología y Venereología (52,53). Otras que se detallarán, no se incluyen en el AJCC, pero se continúan analizando y estudiando, ya que se posicionan como factores independientes de supervivencia. Una correcta estadificación es primordial para ofrecer un pronóstico adecuado al paciente. También es importante de cara a los estudios complementarios a realizar y la planificación terapéutica.

Brevemente, el sistema de estadificación del AJCC se basa en la evaluación del tumor primario (T), siendo el grosor tumoral y la ulceración los principales factores pronóstico; la presencia o ausencia de metástasis linfáticas regionales (N), con el número de ganglios afectados como factor de mayor importancia pronóstica; y las metástasis a distancia (M), siendo el órgano afecto y las concentraciones de lactato deshidrogenasa los factores de mayor significado pronóstico. De este modo, se clasifican los melanomas en estadio I y II para la enfermedad localizada, estadio III para enfermedad regional y estadio IV para la enfermedad metastásica a distancia. Cada estadio está muy correlacionado con la supervivencia (52). La clasificación completa se detalla en los Anexos III, IV y V.

Seguidamente se detallan los factores pronóstico histológicos del tumor primario más relevantes:

#### 1. Índice de Breslow o grosor tumoral

El índice o espesor de Breslow (IB) es una variable continua cuantitativa con una excelente reproducibilidad inter e intraobservador. Se mide en milímetros (mm) desde el estrato granuloso de la epidermis (o desde la base de la úlcera en el caso de un tumor completamente ulcerado) hasta la célula tumoral más profunda en secciones histológicas cortadas perpendicularmente a la superficie epidérmica. Si la parte profunda del tumor estuviese seccionada, se especificará que el grosor es de “al menos...”. Si hay evidencia de regresión debe medirse de la manera habitual hasta la célula tumoral viable identificable más profunda. Si un tumor ha regresado completamente debe asignarse al grupo T0. En casos de melanomas polipoides el IB se mide igualmente desde la granulosa hasta el punto más profundo del melanoma, sin embargo, el nivel de Clark no debe utilizarse.

En la actual clasificación del AJCC se establece 0.8 mm como punto de corte relevante para subdividir el estadio T1 (T1a <0.8 mm sin ulceración, y T1b <0.8 mm con ulceración o 0.8

a 1.0 mm con o sin ulceración). Además, pasa a registrarse con un solo decimal, debido a que diferencias de 0.01 mm son difíciles de reproducir, sobre todo en tumores de menos de 1 mm. Si la centésima va de 1 a 4 se redondeará hacia abajo, mientras que si va de 5 a 9 se redondeará hacia arriba (52).

Desde su definición por Alexander Breslow en 1970 (54) su validez a día de hoy sigue siendo indiscutible: se considera el principal factor pronóstico en pacientes con melanoma localizado. El aumento del grosor del melanoma está altamente correlacionado con la mortalidad específica del melanoma a 10 años ( $p < 0.00001$ ) (41,55,56). La subdivisión de los tumores T1 basada en el grosor del tumor primario en la 8ª edición del AJCC se basa en un análisis de 7.568 pacientes. Se observa que los datos de supervivencia a 5 años para tumores de menos de 1 mm son del 99 %. Los pacientes con tumores con  $IB \geq 0.8$  mm (T1b) tienen menor supervivencia específica de melanoma (SEM) a 10 años que los que tienen  $IB < 0.8$  mm (índice de riesgo 1.7 en el análisis multivariante). Además, se ha visto que la probabilidad de detectar un ganglio centinela positivo en tumores con un espesor  $< 0.8$  mm es más baja ( $< 5$  %) y que la capacidad metastásica aumenta un 10 % por cada aumento de 1 mm de espesor de IB (55). Aun así, existe un subgrupo de pacientes en los que la correlación entre su grosor tumoral y el pronóstico no se cumple. Esto ocurre con más frecuencia en los llamados melanomas “finos” (menos de 1 mm) que a pesar de su buen pronóstico estimado (SEM del 99 % a 5 años y del 96 % a 10 años) podrán desarrollar metástasis (57).

Por otra parte, el IB también tiene sus limitaciones, como la dificultad para medirlo con precisión en presencia de ulceración epidérmica, como se ha señalado previamente, o cuando afecta a otras estructuras perianexiales, como en el melanoma siringotrofo (58). Ante la afectación de estructuras foliculares pueden surgir varios escenarios en los que la medición se dificulta y no hay consenso. En general, cuando un melanoma in situ afecta estructuras foliculares estas no deben considerarse para la medición del IB. Distinto es cuando existe una afectación de estructuras foliculares marcada y el componente invasivo se identifica sólo en la vecindad de estas estructuras (melanoma folicular primario). En estos casos, el IB debe medirse desde la vaina radicular externa del folículo hasta la célula de melanoma invasivo adyacente más lejana, conocido como “grosor folicular”. Otra variable consiste en medir la “profundidad de Breslow folicular”, medida desde la capa de células granulares hasta el melanocito atípico más profundo que se extiende desde el epitelio folicular. Pero dicha medida puede sobreestimar el riesgo de metástasis, ya que no refleja verdaderamente el volumen tumoral. En el informe histopatológico podrían informarse de todas estas medidas (59).

## 2. Ulceración

La ulceración se define como la ausencia completa de epidermis en cualquier zona del tumor asociada a una reacción inflamatoria y presencia de fibrina (de otro modo podría tratarse de un artefacto de procesamiento) en ausencia de traumatismo o procedimiento quirúrgico reciente. Entre las características histopatológicas, el grosor del tumor y la ulceración son los predictores más potentes de supervivencia (41). Su presencia implica que aumente la estadificación de “a” a “b” para cualquier grosor (T). En pacientes con melanoma localizado su presencia reduce la supervivencia a 5 años de 80 a 55 % y la SEM empeora para pacientes con melanomas ulcerados en comparación con los que no lo están (*Hazard ratio* [HR] 2.6) (60). Además, la ulceración fue una de las características más importantes para las tasas de mortalidad en enfermedad localizada y regional en el estudio realizado por Balch *et al.* con más de 17.000 pacientes (41).

### 3. Microsatelitosis

Se diagnóstica con la presencia de nidos tumorales microscópicos cutáneos o subcutáneos localizados adyacentes o profundos al tumor primario, separados por tejido normal (si el tejido es cicatricial o es infiltrado inflamatorio no se consideran microsatelitosis). Se recomienda evaluarla en diferentes cortes histológicos para descartar se trate de una continuación del tumor. Su presencia, aun en ausencia de afectación ganglionar clínica ni lesiones satélite ni en tránsito, hace que un paciente pase a estadio III (52). Es controvertido su papel como factor pronóstico independiente (61), pero hay trabajos que relacionan su presencia con un aumento de la recurrencia locorregional, disminución de la tasa de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y disminución de la supervivencia global (SG) (62).

### 4. Índice mitótico

El índice mitótico (IM) refleja la proliferación celular dentro del tumor primario. Se mide dentro del componente dérmico invasivo del melanoma en la zona con mayor actividad mitótica (“*hot spot*”). Se cuentan las mitosis en dicho punto y después se evalúan los campos adyacentes no superpuestos hasta un área de 1 mm cuadrado ( $\text{mm}^2$ ) y se informa de las mitosis por  $\text{mm}^2$ . No es necesario utilizar tinciones de IHQ para identificar mitosis para el estadiaje, sería conveniente en caso de duda. Ante la falta de estudios sobre el valor de las mitosis epidérmicas y mitosis atípicas, Marsch *et al.* realizaron un estudio retrospectivo con 185 melanomas, sin hallar valor independiente en los análisis multivariantes para las mitosis de localización epidérmicas o atípicas (63). En versiones previas del AJCC el IM subdividía las categorías T1a y T1b como una variable dicotómica con un valor de corte de 1 mitosis por  $\text{mm}^2$  junto con la presencia o ausencia de ulceración (40). Pero en la 8ª edición del AJCC el IM deja de utilizarse como criterio de estadificación T1, aunque debe evaluarse y registrarse en todos los melanomas primarios debido a su valor pronóstico demostrado para todos los espesores de Breslow (55). Un mayor número de mitosis se asocia con una menor tasa de supervivencia: Thompson *et al.* objetivan una disminución de la supervivencia a 10 años del 93 % en melanomas sin mitosis al 48 % para melanomas con más de 20 mitosis por  $\text{mm}^2$ , lo que según los autores refleja la agresividad del tumor (64).

### 5. Nivel de invasión dérmico (Nivel de Clark)

Los niveles anatómicos propuestos por Clark en 1969 se dividen en 5: nivel I (melanoma in situ), nivel II (invasión de la dermis papilar superficial), nivel III (melanoma invasivo que llena y expande la dermis papilar), nivel IV (invasión de la dermis reticular) y nivel V (infiltración del tejido adiposo subcutáneo) (34). Se registra en el informe anatomopatológico pero no se recomienda como criterio de estadificación por su valor pronóstico adicional mínimo (62). En los análisis multivariantes su validez como factor pronóstico se pierde y además, es el grosor del tumor el que guía las decisiones clínicas. Aún así, si analizamos por subgrupos de grosor, el nivel de invasión tuvo valor pronóstico en pacientes con melanomas delgados, en los que las tasas de supervivencia a 10 años disminuyen con el aumento del nivel de invasión y la presencia de ulceración (41).

## 6. Linfocitos intratumorales

Los linfocitos intratumorales se definen como linfocitos que infiltran y destruyen nidos tumorales y/o directamente las células tumorales. El grado de infiltración se describe tanto en extensión como en intensidad. Dicha infiltración linfocitaria se clasifica en 3 niveles (52):

- Ausente: no se identifica infiltrado dentro del tumor. Esto no excluye los linfocitos peritumorales sin extensión intratumoral.
- Infiltración no intensa: el infiltrado está en el tumor de forma focal o afecta a la base del tumor, pero no en toda su longitud.
- Infiltración intensa: infiltración continua de toda la base del tumor o permeación difusa dentro del tumor.

Su presencia se correspondería con la respuesta inmunológica del huésped contra el tumor. Un infiltrado inflamatorio intenso se ha relacionado con mejores datos de supervivencia (56,65). Encontramos estudios contradictorios, probablemente debido a una gran variabilidad interobservador por la falta de unanimidad a la hora de definir el tipo y localización del infiltrado (66,67). Se han intentado desarrollar nuevos métodos para evaluar los linfocitos intratumorales con un sistema de puntuación numérica simple, pero se requieren más estudios para confirmar su validez (65).

## 7. Invasión linfovascular y angiotropismo

La invasión linfovascular se refiere a la presencia de células tumorales dentro de los vasos linfáticos o sanguíneos y se considera un factor de mal pronóstico. Se detecta en láminas de hematoxilina-eosina (HE), y con mayor sensibilidad con estudios de IHQ como D2-40 y CD31. Un estudio retrospectivo con 251 pacientes y seguimiento a 10 años concluye que la invasión linfática es un factor pronóstico independiente que aumenta sobre todo el riesgo de metástasis en los estadios IB y IIA (68). Sin embargo, otros autores no logran demostrar que sea un factor independiente para predecir potencial metastásico, quizás debido a las dificultades en su identificación (69).

El angiotropismo se diagnostica cuando las células de melanoma están estrechamente asociadas con el endotelio de los vasos y su presencia predice una disminución de la SLE, debido a su relación con el desarrollo de recurrencia local o metástasis en tránsito (70).

Ambos parámetros se clasifican como presentes o ausentes. Se necesitan más estudios para aclarar su valor pronóstico, ya que su detección mediante IHQ podría tener impacto en la planificación terapéutica (71).

## 8. Neurotropismo

El neurotropismo es definido como la presencia de células tumorales próximas a los nervios de forma circunferencial (invasión perineural) o dentro del nervio (invasión intraneural). Se observa con mayor facilidad en la periferia del tumor. La presencia de células tumorales alrededor de un nervio en la masa principal del tumor, indica atrapamiento y no debe ser considerado como neurotropismo (52). Se registra como ausente o presente y se recomienda especificar si es focal o extenso y el tamaño de los nervios afectados. Es particularmente frecuente

en melanomas desmoplásicos. Su presencia indica alto riesgo de recurrencia local, sobre todo en casos de extirpaciones con margen escaso (53,61).

### 9. Subtipo histológico

Como se ha comentado anteriormente, los subtipos histológicos clásicos definidos por la OMS (33) tienen un valor pronóstico reducido. Gracias al reciente reconocimiento de diferentes tipos y porcentajes de anomalías mutacionales en los diferentes tipos de melanomas clásicos, hemos visto que ciertos subtipos morfológicos pueden ser predictores de posibles anomalías mutacionales, como por ejemplo en el gen BRAF (14). Comentario aparte merece el melanoma desmoplásico, que debe especificarse si es mixto o puro (más del 90 % del melanoma invasivo asociado a fibrosis estromal prominente). Esta variante supone menos de 5 % de todos los melanomas y aunque localmente agresiva, su pronóstico parece ser mejor que el de otros melanomas en el mismo estadio, con tasas más bajas de positividad del ganglio centinela y menor desarrollo de metástasis a distancia (72).

### 10. Regresión tumoral

La regresión se define como un reemplazo parcial o completo del tumor por infiltrado inflamatorio, fibrosis y melanófagos. En el informe histopatológico debe especificarse si es mayor o menor al 75 %. Si la regresión está presente a una profundidad mayor que el IB, la profundidad de regresión no se suma a la medición del espesor. Sin embargo, se puede añadir un comentario al respecto (62). Su correlación con el pronóstico es también motivo de debate y controversia. Al igual que con los linfocitos intratumorales, hay ausencia de criterios uniformes en cuanto a la definición y clasificación de su extensión. En diferentes estudios no se encuentra relación de su presencia con el pronóstico (67). En otros, sin embargo, la regresión predice peor pronóstico, con mayor posibilidad de positividad si se realiza la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC), por lo que algunos grupos han llegado a recomendar su realización en melanomas con regresión extensa (>75 %), sobre todo en aquellos con IB <0.76 mm (73). Un estudio reciente con 4.790 pacientes, encuentra regresión en un 22.6 % de los casos, relacionando su presencia con buen pronóstico: menor posibilidad de metástasis en la BSGC y mejor SEM. Pero en este estudio solo se evaluó la presencia o ausencia de regresión sin evaluar su grado (74).

### 11. Elastosis solar

La elastosis es un marcador de exposición solar acumulada. Los melanomas que se presentan con marcada elastosis solar suelen aparecer en pacientes de mayor edad y con menor número de nevos (75,76). Se evalúa en la piel adyacente al melanoma y se puede clasificar en una escala de 4 categorías (nula, leve, moderada y marcada) (76) pero existen diferentes métodos para graduar su intensidad, desde ausente/presente (66) a métodos más detallados como propone Landi *et al.* (77).

Su valor pronóstico no ha sido muy estudiado, llegando a considerarse su presencia como factor protector en relación a la supervivencia (66). La nueva clasificación propuesta para el melanoma vuelve a darle valor a la elastosis solar (39). Los melanomas se clasifican en base al DSA de la piel circundante, y se observa que aquellos con alto DSA y poca elastosis solar tienen alteraciones genéticas distintivas de aquellos que aparecen en piel con alto DSA y elastosis solar marcada (ver apartado 3.7. Clasificación integradora).

## 12. Nevo asociado

Se define por la coexistencia de componente de nevo y melanoma en el estudio histopatológico. Cabe destacar que la medida del IB puede dificultarse ante la coexistencia de nevo previo y también puede hacer más complejo evaluar la extensión perianexial (53). La prevalencia de nevo asociado a melanoma es variable según los estudios, debido a su heterogeneidad en su recogida y clasificación, y lo mismo ocurre en referencia a su valor pronóstico. Una reciente revisión sistemática que seleccionó 38 estudios para su metaanálisis cifra la prevalencia en un 29 % y concluye que los melanomas asociados con nevo se presentan con IB medio significativamente más bajo que los melanomas de novo (20).

## 13. Densidad de Breslow

Alexander Breslow (54) en su artículo original sugirió que el volumen tumoral, combinando el diámetro máximo y el grosor, podría aproximar mejor el pronóstico que una medida unidimensional, aunque finalmente utilizó el grosor tumoral o IB como medida más significativa. La utilización de una medida bidimensional, como el volumen, reflejaría mejor la carga de células cancerígenas y podría tener mejor valor pronóstico. El volumen tumoral tiene valor predictivo en muchos otros tumores como carcinomas de próstata y mama, cáncer de cabeza y cuello y linfoma de Hodgkin (78).

A lo largo de los años diferentes autores han estudiado el volumen tumoral en el melanoma (79–86), comprobando en muchos casos que volúmenes más grandes se correlacionan con un peor pronóstico y un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (tabla resumen en Anexo VI).

Friedman *et al.* (81) estudian 35 melanomas mediante una fórmula matemática, tras el procesado de la muestra haciendo secciones de 2 mm, establecen 200 mm<sup>3</sup> como punto de corte de volumen indicador de peor supervivencia a 5 años. Posteriormente, Binder *et al.* (82) calculan el volumen nuclear ponderado, confirmandose su valor pronóstico independiente para melanomas finos y, por otra parte, Mossbacher *et al.* (84) hacen una estimación estereológica del volumen nuclear medio en 32 melanomas gruesos (>4 mm) observando que a mayor volumen nuclear más tendencia a desarrollar metástasis. En 1996, Bahmer *et al.* (83) estudian 34 melanomas a los que aplican el método de Cavalieri para calcular el volumen tumoral, pero utilizan un método tan complejo de procesamiento de la muestra, mediante múltiples cortes, que lo convierte en poco práctico. Estudios más recientes acerca del volumen tumoral evalúan su valor pronóstico (85,86). En ambos, la fórmula para su cálculo (grosor tumoral x área elipsoidal de la lesión clínica) implica tener datos de la medida macroscópica del melanoma, no siempre disponible ni intercambiable por la medición patológica macroscópica del tumor. Además, muchos melanomas tienen un patrón de crecimiento irregular, para los cuales el cálculo del área sería impreciso. En resumen, la mayoría de estos métodos de estimación del volumen son complejos y difíciles de aplicar, y una de las características valiosas que debe tener un nuevo parámetro es ser simple y fácilmente reproducible.

Por este motivo, en 2016, Rashed *et al.* (87) describen el concepto de Densidad de Breslow (DB), el cual representa el porcentaje de la dermis ocupado por células de melanoma, y lo evalúan en la misma posición en la que miden el IB. Estudian 100 melanomas y demuestran que, aunque existe una fuerte correlación entre la DB y el IB, ambos son factores independientes

para predecir SG. El fundamento de este enfoque es que la estimación del pronóstico del melanoma en casos con el mismo IB podría mejorarse midiendo la densidad de las células tumorales invasivas: dos melanomas con el mismo IB pueden tener una densidad celular tumoral diferente y cabría esperar que los casos con mayor carga tumoral tuvieran un peor pronóstico. Además, la medición de la DB puede realizarse en segundos, sin necesidad de material adicional, en la misma lámina de HE. También comprueban la concordancia interobservador del nuevo parámetro, obteniendo un coeficiente de correlación intraclase (CCI) de 0.96. Por otra parte, exploran la posibilidad de combinación del IB y la DB para mejorar la predicción de la supervivencia a 5 años, concluyendo que se necesita validación externa para generalizar su uso (en conjunto mejoran el área bajo la curva [AUC] de un 94.8 % del IB a un 96.7 % al combinarlos) (87).

El mismo grupo de trabajo continúa explorando el concepto de la DB analizando 1.329 melanomas. Nuevamente confirman la fuerte concordancia interobservador del parámetro (CCI 0.93) y su valor pronóstico independiente para la SG, la SEM y la supervivencia libre de metástasis (SLM). Cuando evalúan la DB y su relación con otros factores pronóstico conocidos como la edad, sexo, IB, localización del tumor, subtipo histológico, ulceración, IM, presencia de microsátelites y estadio tumoral, al realizar el análisis multivariante, la DB, IB, ulceración e IM obtuvieron resultados significativos en relación a la SG, SEM y SLM. La media de DB de sus melanomas se situó en el 60 % y proponen un punto de corte de  $DB \geq 65\%$  que permitiría elevar el estadio T de un melanoma de “a” a “b” en un 27 % de sus casos, ya que se consideraría que estos pacientes tendrían melanomas de más alto riesgo. De igual modo, una DB baja y la ausencia de ulceración significaría un bajo de riesgo de progresión para ese melanoma. Por otra parte, el uso combinado del IB y la DB, obtiene una capacidad pronóstica superior, y actúa como una aproximación cruda a la carga tumoral. Es por ello que proponen incorporar este parámetro morfológico en futuras versiones del AJCC como un complemento (88).

Saldanha *et al.* (89) un año después, proponen un nuevo concepto que incluye la DB, el área tumoral calculada (ATC), argumentando que mejora la DB en el sentido de que el ATC evalúa las células en la totalidad del melanoma invasor mientras que para el cálculo de la DB se utiliza solo una ventana de 2 mm. Tras los análisis, el ATC fue superior al IB como factor pronóstico y concluyen que sus hallazgos necesitan ser validados.

El trabajo más reciente que sobre la DB concluye que la DB tiene más valor como indicador pronóstico para la SLE que para la SG, como limitaciones destaca su pequeño tamaño muestral (19 pacientes) y que no incluye tumores en estadio pT1 ni pT2 (su IB medio es de 5 mm y su DB media es de 70 %) (90).

### 3.8.3. Factores pronóstico genético-moleculares

Las pruebas para predecir mutaciones en ciertos oncogenes nos ayudan a realizar un diagnóstico más preciso y a seleccionar pacientes para tratamiento en caso de melanoma avanzado. Además, han demostrado su valor como factor pronóstico (91).

## 1. BRAF

El gen BRAF es un promotor tumoral que codifica una serina/treonina cinasa que activa la ruta de las MAPK regulando el crecimiento, supervivencia y diferenciación tumoral. Las mutaciones somáticas en BRAF son frecuentes en melanomas primarios, metastásicos y nevos melanocíticos. En concreto, está presente en un 40-60 % de los melanomas cutáneos primarios. La mutación más frecuente es la sustitución de una valina por un glutamato en el codón 600 del exón 15 (BRAF V600E), presente hasta en un 80 % de los casos; en un 15 % se sustituye por una lisina (BRAF V600K) y en 5 % de los casos encontramos otras mutaciones (V600R / M / D / G); pero se han descrito hasta 30 mutaciones diferentes, con distinta actividad biológica y posibles características tumorales heterogéneas (92).

Tras producirse la mutación se activa constitutivamente la proteína BRAF conduciendo a la proliferación neoplásica (17). En condiciones fisiológicas RAS se une al nucleótido guanósino trifosfato y activa la cascada de la vía de señalización de las cinasas RAS-RAF-MEK-ERK, dando lugar a proliferación celular, con un sistema de retroalimentación negativo de control. Cuando RAF muta, esta vía se activa constitutivamente, sin necesidad de la unión ligando-receptor, por lo que se produce un crecimiento del tumor sin límite (93).

Se dispone de fármacos que inhiben específicamente BRAF, por lo que se entiende la importancia de conocer su estado mutacional en la práctica clínica diaria. Los principales métodos para determinarlo son los siguientes (94):

a. Secuenciación: la secuenciación de Sanger se ha utilizado como referencia en investigación para determinar el estado mutacional de los tumores. La pirosecuenciación es más rápida y más sensible. Puede detectar la mutación V600E y otras menos frecuentes, pero su sensibilidad es baja, pudiendo dar lugar a falsos negativos.

b. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR): actualmente el método más utilizado, por su rapidez y sensibilidad, además de ser económica. La prueba Cobas® 4800 BRAF V600 es la más utilizada.

c. Anticuerpo monoclonal frente a la proteína mutada BRAF V600E (VE1): se detecta la mutación por IHQ en parafina, pero como desventaja solo detecta la mutación V600E.

d. Biopsia líquida: técnica emergente en proceso de validación que detecta células tumorales en sangre periférica, ADN tumoral o micro ácidos ribonucleicos (micro-ARN) circulantes.

e. Secuenciación de próxima generación (NGS): para identificar otras alteraciones moleculares en las muestras en las que no identificamos la mutación V600. Maximiza las mutaciones procesables, algunas de las cuales podrían ser dianas de tratamiento en el futuro. Hoy en día se considera más una herramienta de investigación.

En relación al valor pronóstico de la mutación de BRAF los resultados de los estudios son contradictorios. Hay trabajos que informan que los portadores de la mutación tienen una supervivencia menor que los no portadores (95,96). En un estudio retrospectivo que incluyó 147 pacientes se demostró que BRAF mutado era factor pronóstico de peor SLE (97). Hallazgos similares encontraron Ardekani *et al.* (91) realizando un metaanálisis con un total de 674

pacientes con melanoma en los que se demostró que la mutación de BRAF (presente en un 47.8 % de los pacientes) era un factor de riesgo absoluto para la supervivencia aumentando el riesgo de mortalidad en 1.7 veces. Long *et al.* (98) observan una mediana de supervivencia de los pacientes con melanoma metastásico de 5.7 meses para los pacientes con mutación de BRAF y de 8.5 meses para los pacientes BRAF no mutado. Mientras tanto, otras publicaciones no encuentran diferencias en relación a la presencia de la mutación de BRAF y la supervivencia de los pacientes o los resultados no son concluyentes (38,99–101). En algunos casos, como el trabajo de Maldonado *et al.* (38), extrapolan supervivencia a través del desarrollo de metástasis o muerte por enfermedad, y el seguimiento medio es de sólo 37 meses. En un estudio con 365 melanomas cutáneos primarios, Broekaert *et al.* (101), concluyen que los pacientes con BRAF mutado tienen mayor propensión a metastatizar en los ganglios linfáticos regionales que a otros niveles, pero esto no tuvo una asociación significativa con la SG ni con la SLE. Estas diferencias pueden deberse a varios factores: pacientes incluidos en diferentes estadios tumorales, que los estudios sean retrospectivos o prospectivos, los criterios objetivo para evaluar supervivencia (SLE, libre de recurrencia, SG...), etc. Sin embargo, sí está demostrado que los tumores primarios con mutación BRAF asocian ciertas características diferenciales: parecen ser tumores más gruesos, ulcerados con mayor frecuencia y también muestran un mayor número de mitosis (95,97,100). También se ha observado que los melanomas con BRAF mutado se presentan en pacientes más jóvenes (15,38,102), con lesiones localizadas en zonas de exposición solar intermitente, como el tronco y extremidades, y suelen tener mayor número de nevos (14,38,100,102–104). Por otra parte, histológicamente muestran menor elastosis solar, una prominente dispersión de los melanocitos a la epidermis, mayor formación de nidos intraepidérmicos y abundante pigmento (15,101). Tras estos estudios, se podría concluir que si la mutación está presente, el paciente mostraría un fenotipo clínico-patológico distintivo. De hecho, Viros *et al.* pudieron predecir la mutación de BRAF con un 91.8 % de precisión usando una combinación de características histomorfológicas (15).

Todos estos estudios se ven desde otra óptica desde la irrupción de las terapias diana en el año 2012. Hasta ese momento el único tratamiento que había demostrado aumentar la supervivencia de los pacientes era la cirugía. Pero actualmente los pacientes con melanoma avanzado con BRAF mutado tienen mejores tasas de SG cuando son tratados con inhibidores de BRAF (vemurafenib, dabrafenib y encorafenib) y MEK (trametinib, cobimetinib y binimetinib) (105). Posteriormente, se demostró que la combinación de inhibidores de BRAF e inhibidores de MEK era más eficaz, pues incrementa la duración de la respuesta y disminuye las resistencias (106). Es por esto que la monoterapia se ha abandonado y los fármacos se emplean combinados (por ejemplo vemurafenib más cobimetinib, dabrafenib más trametinib, encorafenib más binimetinib).

## 2. NRAS

Mutaciones puntuales en RAS pueden activar la vía de las MAPK y también promover supervivencia a través de la vía de señalización del fosfatidilinositol-3-cinasa. Entre los genes de RAS las mutaciones más frecuentes se encuentran en NRAS (codón 60 o 61 del exón 2 y codón 12 o 13 del exón 1), en un 15-20 % de los melanomas, y su hallazgo suele excluir la presencia de la mutación de BRAF.

La mutación de NRAS se asoció con mayor edad al diagnóstico (96,100), con subtipo histológico nodular y melanomas de aparición en piel con daño solar crónico (18,100). También mostraron tendencia a localizarse en extremidades, ser más invasivos, y con mayor posibilidad

de que los pacientes se presenten en estadios más avanzados en comparación con pacientes no portadores de mutaciones en BRAF ni NRAS (96,104). Su valor pronóstico no solo se demostró en melanoma localizado, en un estudio con 677 pacientes con melanoma metastásico se observó que NRAS está asociado independientemente con menor SG tras el diagnóstico de metástasis (107). Contrariamente, otros estudios no encuentran diferencias en relación a la supervivencia (104).

A diferencia de BRAF, aun no se han desarrollado inhibidores de RAS específicos, por lo que es urgente el desarrollo de fármacos contra esta diana terapéutica.

### 3. Otras alteraciones moleculares

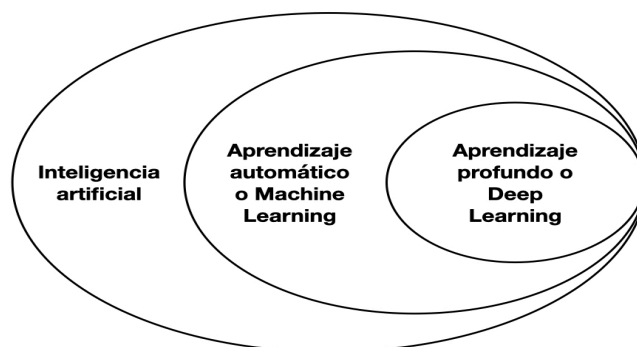
Las mutaciones en BRAF son un evento precoz en el desarrollo del melanoma, detectado frecuentemente en nevos y nevos displásicos, no siendo suficientes para desarrollar un melanoma. La posterior progresión a lesiones intermedias y melanoma requiere de estímulos mutagénicos adicionales, como por ejemplo mutaciones en TERT. Para adquirir potencial invasivo se verán con frecuencia mutaciones en CDKN2A y finalmente, en los melanomas metastásicos se pueden encontrar mutaciones en PTEN y TP53 (1).

a. Pérdida o desactivación de CDKN2A: el gen CDKN2A produce la proteína p16INK4a, que inhibe las cinasas 4 y 6 dependientes de ciclina, por lo que, aunque la proteína BRAF se sobreexpresa, el ciclo se detiene y puede controlarse. Su pérdida o desactivación se da en un 10-40 % de los melanomas esporádicos y en hasta un 50 % de los melanomas familiares, con alta penetrancia (1).

b. Amplificación del factor de transcripción asociado a microftalmía: puede activarse por la vía de las MAPK o por la vía del adenosin monofostato cíclico, regulando desarrollo, diferenciación y mantenimiento de los melanocitos. Su amplificación, presente en un 20-30 % de los melanomas, se correlaciona con menor supervivencia y resistencia a quimioterapia (108).

### 3.9. INTELIGENCIA ARTIFICIAL APLICADA AL ÁMBITO MÉDICO

La inteligencia artificial (IA) es una rama de las ciencias de la computación que incluye conceptos transversales vinculados a la lógica y al aprendizaje. Se ocupa de resolver problemas cognitivos relacionados con la resolución de problemas, el reconocimiento de patrones y el aprendizaje. Los sistemas de IA se pueden clasificar en simbólicos y conexionistas. Los modelos simbólicos, o sistemas expertos, emplean el conocimiento existente y utilizan lenguajes formales para programar una serie de pasos no ambiguos para predecir una variable objetivo a partir de unos datos de entrada. Por su parte, los modelos conexionistas se basan en algoritmos que aprenden de manera automática las relaciones entre los datos de entrada y la variable objetivo, a partir de un conjunto de datos de entrenamiento, con la capacidad de encontrar nuevas relaciones entre ellos. Es por ello por lo que también se les denomina como modelos de aprendizaje automático o *Machine Learning* (ML). Por último, el aprendizaje profundo o *Deep Learning* (DL), variante particularmente efectiva de ML, desarrolla su aprendizaje a través de redes neuronales artificiales (RNA) con múltiples capas que procesan la información con un nivel de complejidad ascendentes (109, 110).



**Figura 5.** Diagrama de Venn en el que vemos que el *Deep Learning* es un tipo de *Machine Learning*, y su vez una de las aproximaciones dentro de la inteligencia artificial

Estos modelos están inspirados en la estructura y funcionamiento del cerebro humano (111). Las RNA son muy eficaces en la detección de patrones y aprenden a reconocer conceptos de manera similar al sistema visual del cerebro. Las primeras capas reconocen conceptos de bajo nivel, por ejemplo, bordes. Las capas superiores aprenden a reconocer conceptos de alto nivel jerárquico como cara o partes de objetos (112).

En la última década se han producido grandes avances en el campo de la IA, especialmente en ML, existen dos motivos principales:

- **Datos:** Han aumentado de manera exponencial la cantidad y diversidad de datos existentes actualmente, surgiendo el concepto de *Big Data* (113).
- **Algoritmos:** Se han desarrollado nuevos algoritmos y técnicas de entrenamiento que permiten entrenar modelos que aprendan de la gran cantidad de datos existentes.

La IA se ha convertido en una herramienta valiosa para la sociedad, pero también para los médicos. Se ha empleado en el campo de la medicina desde mediados del siglo XX. Los primeros casos de uso se basaban en sistemas expertos, los cuales eran muy costosos de crear y tenían poca capacidad de generalización. Sin embargo, el uso de técnicas de ML en el campo de la medicina se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, especialmente para el diagnóstico precoz y predicción de resultados de pruebas médicas (114). A otros niveles asistenciales, la IA se ha incorporado en la prevención de patologías, reconocimiento facial en el diagnóstico de enfermedades raras y predicción de reacciones adversas a fármacos. Además, permite examinar grandes cantidades de datos de los registros médicos electrónicos (115,116). Otro punto de avance importante en medicina es en el campo de la robótica, tanto en el laboratorio como en el campo quirúrgico (111). El uso de la IA transformará la forma de entender la medicina, y todo hace prever que dará paso a una atención médica más eficiente.

### 3.9.1. Inteligencia artificial en Oncología cutánea

En los últimos años las publicaciones sobre IA y Oncología cutánea han aumentado exponencialmente. En un inicio los esfuerzos iban dedicados principalmente a la diferenciación de imágenes de lesiones melanocíticas (117) y posteriormente se desarrollaron modelos pronósticos automatizados. Un ejemplo de ello son métodos computacionales que predicen progresión metastásica a partir de datos de micro-ARN y de expresión génica de pacientes con melanoma (118). Un campo muy interesante, y en el que existe cada vez mayor interés, es el uso de técnicas de IA en el diagnóstico precoz mediante imágenes. Una de las publicaciones que mayor eco ha tenido fue la realizada por Esteva *et al.* (119). En su trabajo clasifican lesiones cutáneas usando redes neuronales, tras entrenar con un conjunto de datos de casi 130.000 imágenes. Enfrentan su algoritmo contra 21 dermatólogos y demuestran que la IA es capaz de clasificar lesiones de cáncer cutáneo con un nivel de precisión diagnóstica similar a la de un dermatólogo experto.

### 3.9.2. Inteligencia artificial para predecir la mutación de BRAF

Actualmente, el aumento de supervivencia de los pacientes con melanomas estadio III y IV que reciben tratamiento con inhibidores de BRAF y MEK ha convertido las pruebas de mutación de BRAF en una prioridad para seleccionar los tratamientos (94). Con anterioridad se han descrito los principales métodos para determinar el estado mutacional de BRAF, pero existen otros más novedosos y menos accesibles. Su sensibilidad y especificidad varían desde el 80 al 100 % y del 90 al 100 %, respectivamente. La IHQ se posiciona aquí como una alternativa económica y técnicamente más sencilla, con una sensibilidad del 93 % y una especificidad del 92 %. Por otra parte, se admite que la IA aplicada a la histopatología puede ayudar en las predicciones, pero apenas hay estudios que correlacionen la presencia de mutaciones específicas con patrones morfológicos. Coudray *et al.* (120) entrenaron un modelo de RNA para clasificar imágenes histopatológicas obtenidas de “*The Cancer Genome Atlas*” de muestras de adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas o tejido pulmonar normal. Predijeron el estado mutacional de 6 de los 10 genes más comúnmente mutados en adenocarcinoma de pulmón (STK11, EGFR, FAT1, SETBP1, KRAS y TP53) con AUCs que oscilaron entre 0.733 y 0.856. La mutación de estos genes en particular podría predecirse a partir de imágenes de láminas de HE, lo que sugiere que las características celulares están relacionadas de alguna manera con su estado mutacional.

Diferentes autores han utilizado técnicas de IA en melanoma para predecir la mutación de BRAF a partir de datos clínicos y características morfológicas de las láminas de HE. Viros *et al.* (15) proponen el uso de un clasificador empleando modelos basados en árboles de decisión conocidos como “selvas aleatorias” (*Random Forest*). Un árbol de decisión es un modelo predictivo formado por reglas binarias, que permite representar los eventos que surgen desde que se toma una decisión entre un abanico de posibilidades. Estos árboles son considerados modelos de aprendizaje débiles (por su baja capacidad de aprendizaje), pero pueden combinarse haciendo que el modelo sea más robusto; por ejemplo, con las “selvas aleatorias”. Este método genera muchos árboles de clasificación binarios independientes, basados en subconjuntos de datos diferentes, y genera una predicción de la probabilidad de mutación combinando las

predicciones de los árboles individuales que forman el modelo. De este modo, los autores predijeron la mutación de BRAF con una precisión del 90.8 % (frente a la predicción casual que sería de un 50 %), resultando la edad superior a 55 años como el factor más importante a la hora de predecir la presencia de mutación BRAF. Posteriormente, y siguiendo la misma línea de investigación, Broekaert *et al.* (101) evalúan las características clínicas e histomorfológicas de 365 melanomas y las correlacionan con el estado mutacional de BRAF y NRAS, aplican un árbol de decisión binario único para predecir el estado mutacional de BRAF con un 60.3 % de precisión, resaltando la pigmentación y la presencia de elastosis solar como puntos clave para predecir BRAF. Los algoritmos de IA utilizados en estos trabajos tienen algunas limitaciones, por ejemplo, cada árbol se entrena con distintas muestras de datos de un mismo problema, pero ningún árbol ve todos los datos en conjunto, por eso a día de hoy están en desuso.

Actualmente hay dos tipos de algoritmos que obtienen muchos mejores resultados a la hora de resolver problemas de clasificación, *gradient boosting machines* (GBM) y las RNA:

- GBM permite obtener modelos predictivos basados en árboles de decisión, pero con una ventaja frente a los previos: cada árbol intenta corregir los errores de los modelos anteriores según los va generando; es decir, el segundo árbol corrige los errores del primer árbol y así sucesivamente. El modelo resultante es una combinación de todos los árboles, pero con una capacidad predictiva superior a los modelos individuales en los que se basa. Dentro de los GBM tenemos 2 tipos principales: *Extreme Gradient Boosting* (XGBoost) y *Light Gradient Boosted Machine* (LightGBM), ambos muestran un potente poder predictivo y enfoques fáciles de implementar (121,122). LightGBM tiene como ventaja que se entrena hasta 20 veces más rápido (123).
- Las RNA son modelos inspirados en el funcionamiento del cerebro. Las RNA están compuestas por elementos de procesamiento que son simples, pero altamente interconectados. La neurona artificial recibe las entradas, las integra mediante una función de activación y genera una señal de salida que se transmite a otras neuronas (124).



## 4. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El melanoma es el principal responsable de la mayoría de muertes por cáncer cutáneo. Su manejo se decide en función al estadio según el AJCC y el pronóstico se establece a partir de un conjunto de características clínico-patológicas que permiten estimar la supervivencia de los pacientes. Entre ellas y en ausencia de afectación regional o sistémica, el IB, la presencia de ulceración y el IM son los más importantes (125).

Aun así, existen pacientes en estadios tempranos que desarrollan metástasis. Por eso es de vital importancia identificar nuevos factores pronósticos histológicos y moleculares para mejorar la estimación individualizada de riesgo. Además, en función de esto, se toman decisiones importantes en relación al manejo (márgenes quirúrgicos, indicación o no de la BSGC), seguimiento y opciones terapéuticas.

En la actualidad el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico molecular es exponencial, pero la realidad es que su empleo en la práctica diaria es limitado: son poco accesibles y costosas. Por todo ello, se necesitan nuevos marcadores de bajo coste y simplicidad, fáciles de implementar en la práctica clínica diaria.

Se propone la estandarización de la DB, parámetro que permite estimar el volumen tumoral, dado que por su carácter bidimensional es probable que refleje mejor la carga tumoral y pueda colaborar en la predicción del comportamiento de un melanoma.

Además, se ha tratado de comprobar la utilidad de la IA en la predicción del estado mutacional de BRAF creando un árbol de decisión, para lo cual nos hemos basado en ciertas características clínicas e histopatológicas de los melanomas. A partir de los algoritmos utilizados obtenemos las características que resultan más importantes para predecir BRAF. Se han empleado técnicas de interpretabilidad que muestran qué tipo de correlación tiene cada variable con la presencia de mutación y posteriormente creamos un árbol de decisión. Esto podría posicionarse como un método alternativo, barato y fácil para predecir la mutación de BRAF. Se destaca, además, la introducción de la DB como parámetro clave para esta predicción.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

- Analizar la Densidad de Breslow como nuevo factor pronóstico en melanoma y su relación con las características clínicas e histopatológicas de los melanomas.

### **5.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Examinar la relación de la Densidad de Breslow con el estado mutacional de BRAF.
- Examinar la Densidad de Breslow como predictor de mortalidad.
- Estimar la mutación de BRAF a partir de las características clínico-patológicas del melanoma empleando técnicas de inteligencia artificial.



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, retrospectivo, con pacientes del Área Sanitaria de Santiago de Compostela y Barbanza. El periodo de recogida de datos de los melanomas incluye un intervalo ininterrumpido de 39 meses.

### 6.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población a estudio comprendió aquellos pacientes diagnosticados de melanoma invasivo cutáneo primario, confirmados histológicamente, procedentes de la base de datos del Departamento de Anatomía Patológica del Área Sanitaria de Santiago de Compostela y Barbanza.

Los criterios de exclusión fueron haber sido diagnosticado de melanoma spitzoide, melanoma de mucosas, melanoma acral, melanoma in situ y aquellos pacientes con melanoma metastásico al momento del diagnóstico. También se excluyeron los pacientes cuyas muestras no eran válidas para el estudio citogenético.

### 6.3. RECOGIDA DE DATOS

La base de datos utilizada para la recogida de las variables histológicas fue el sistema EOS del Departamento de Anatomía Patológica. La búsqueda de los melanomas se realizó en función de la codificación diagnóstica del Departamento de Anatomía Patológica (SNOMED CT). Además, para la recogida de parámetros clínicos se utilizó como fuente la base de datos la historia clínica electrónica utilizada en el SERGAS (IANUS). Las variables se registraron en una base de datos anonimizada creada a tal efecto, confidencial y manejada exclusivamente por el equipo investigador.

### 6.4. ASPECTOS ÉTICO-LEGALES

Se trata de un estudio observacional en el que la información obtenida procede de la práctica clínica habitual y de los registros de Anatomía Patológica. El uso de datos, en su mayoría histológicos, con pocos datos clínicos, junto a su tratamiento mediante seudonimización resultan en la práctica imposibilidad de identificación de los pacientes. Se ha garantizado la

confidencialidad de los datos asegurando el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

Previo inicio del estudio se obtuvo la opinión favorable por parte del Comité de Ética de Investigación de nuestra área de referencia (Santiago-Lugo) para su realización (Código de Registro: 2016/129).

En relación a la memoria económica, esta tesis doctoral se ha desarrollado como parte de una iniciativa del equipo investigador. No se han recibido retribuciones por realizar este estudio. La autora y directores declaran no tener ningún conflicto de interés en relación con esta tesis doctoral.

## **6.5. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES**

### **6.5.1. Variable primaria**

Densidad de Breslow (DB): la variable principal fue calculada según la descripción de Rashed *et al.* (87). En resumen: se utilizan las mismas secciones histológicas de HE en las que se mide el IB. A bajo aumento se proyecta una ventana virtual que incluye el área dérmica ocupada por la parte infiltrativa del melanoma y que contenga la célula más profunda de melanoma (es decir, la misma zona en la que medimos el IB). El límite superior se corresponde con la capa basal de la epidermis, pasando bajo los nidos de la unión. El ancho se corresponde con el del campo de aumento de 10x (aproximadamente 2 mm). Se ajusta el eje horizontal para maximizar el área de dermis ocupada por el mayor número de células de melanoma, incluyendo en todo caso la célula más profunda. Por último, se calcula en porcentaje la proporción de dermis ocupada por células de melanoma (se estima al 5% más cercano y en puntuaciones inferiores a 5 % y mayores a 95 % la precisión será del 1 %) (figuras 6-7).

Existen ciertas particularidades en la medición. Por ejemplo, en melanomas ulcerados, la medida vertical será la misma que el IB. En melanomas muy gruesos, en los que no podemos ver todo el campo, se realiza un escaneo vertical de toda el área rectangular. En melanomas en los que el diagnóstico inicial fue una biopsia en sacabocados o biopsia incisional, se puede calcular la DB si en la biopsia se encuentra la célula de melanoma más profunda y la muestra tiene un ancho mínimo de 10x. En caso contrario, habría que revisar en conjunto la biopsia y extirpación final para ajustar el cálculo. Si no es posible, no podría calcularse la DB.

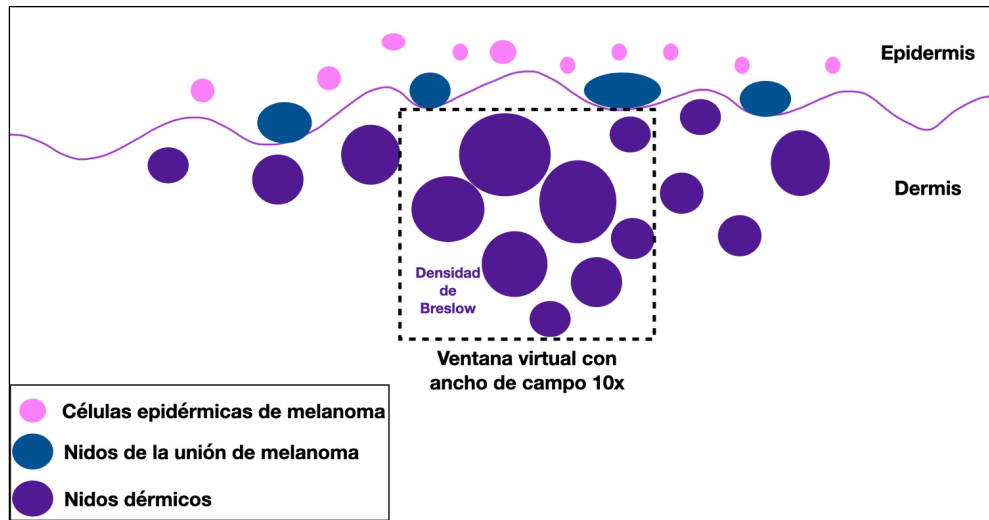


Figura 6. Esquema de la medición de la Densidad de Breslow.

Nota: para ejemplificar la ventana se ha usado un rectángulo como simplificación, pero el límite superior se correspondería con la capa basal de la epidermis y el límite inferior debe seguir las ondulaciones que se presenten

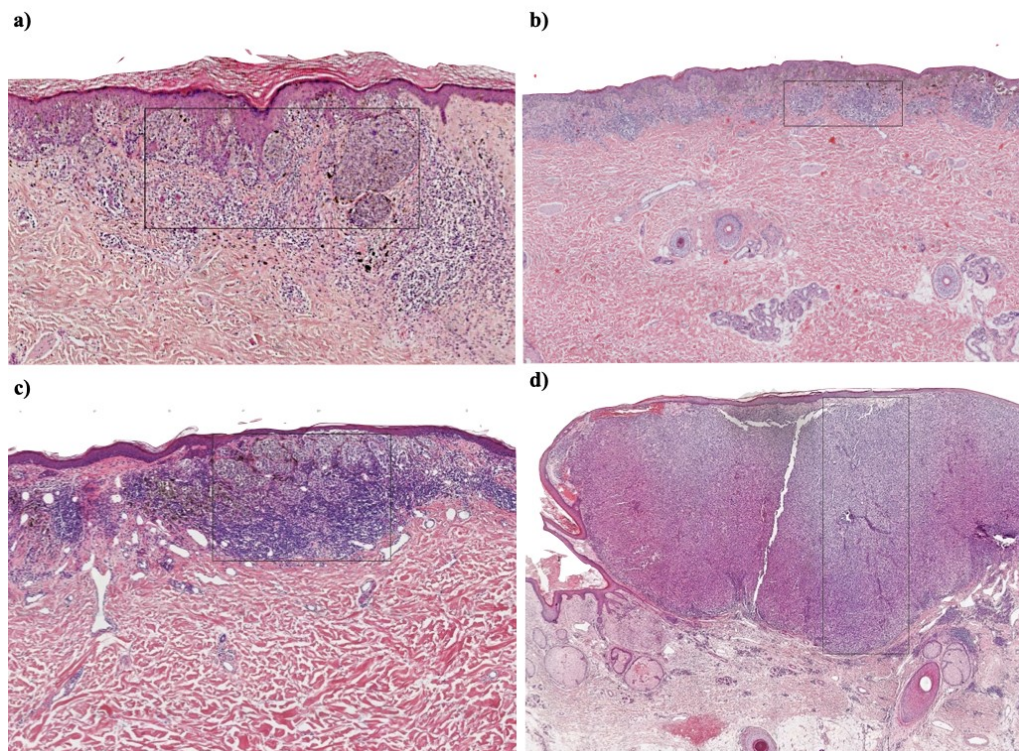


Figura 7. Casos de melanomas en los que se ha medido la Densidad de Breslow. El ancho de la ventana es el diámetro del objetivo 10x: a) índice de Breslow 0.6 mm, Densidad de Breslow 5%; b) índice de Breslow 0.3 mm, Densidad de Breslow 15%; c) índice de Breslow 0.8 mm, Densidad de Breslow 55%; d) índice de Breslow 3.6 mm, Densidad de Breslow 95%

### 6.5.2. Variables secundarias

- a) Edad al diagnóstico
- b) Edad de fallecimiento
- c) Fecha de diagnóstico histopatológico: se corresponderá con la fecha de registro de entrada en el Departamento de Anatomía Patológica de la primera biopsia, escisional o incisional, que confirme el diagnóstico
- d) Sexo: hombre, mujer
- e) Localización del melanoma: cabeza y cuello, tronco, extremidades inferiores y extremidades superiores
- f) Tipo histológico de acuerdo con la OMS (39): MES, MN, LMM, otros
- g) Estadio tumoral según el sistema de estadificación del AJCC (52)
- h) Realización de la técnica de la BSGC y resultado
- i) Fecha de la progresión del melanoma
- j) Tipo de progresión: recurrencia local, afectación ganglionar, metástasis a distancia
- k) IB: medido en milímetros y con un solo decimal
- l) Presencia o ausencia de ulceración
- m) IM: se expresa como número de mitosis por mm<sup>2</sup>
- n) Presencia o ausencia de nevo asociado
- o) Linfocitos intratumorales: ausentes, infiltración no intensa, infiltración intensa
- p) Características morfológicas:
  - Dispersión intraepidérmica de melanocitos (modificado de Viros *et al.* (15)): cálculo del número de melanocitos intraepidérmicos y su relación con la capa basal, clasificado de 0 a 3 siguiendo estos criterios: 0, todos los melanocitos se sitúan en la capa basal; 1, del 75 al 99 % de los melanocitos están situados en la capa basal; 2, entre el 50 y el 74 %; 3, menos del 50 % de los melanocitos se sitúan en la capa basal. También agrupada en: todos los melanocitos se sitúan en la capa basal frente a menos del 100 % de los melanocitos se sitúan en la capa basal.
  - Nidos (modificado de Viros *et al.* (15)): melanocitos formando grupos en lugar de aislados, clasificados de 0 a 3: 0, los melanocitos se presentan como células sueltas; 1, menos del 25 % de las células se presentan en nidos; 2, de 26 al 49 % de las células se agrupan en nidos; 3, más del 50 % de los melanocitos intraepidérmicos se presentan en nidos.

- Epidermis en la zona ocupada por el melanoma comparada con la piel adyacente (modificado de Viros *et al.* (15)): graduada de 0 a 2: 0, epidermis similar a la de piel adyacente; 1, atrófica, con atenuación de las crestas; 2, hiperplásica. También agrupada como normal/atrófica frente a hiperplásica.
- Circunscripción lateral (modificado de Viros *et al.* (15)): se evalúa la transición desde el tumor a la piel normal, graduada de 1 a 3: 1, nítida; 2, gradual; 3, discontinua definida como epidermis aparentemente normal intercalada con tumor.
- Elastosis solar: graduada de 0 a 3 según la siguiente definición (modificado de Landi *et al.* (77)): 0, sin elastosis o fibras elastóticas muy ocasionales (considerada ausente); 1, fibras elastóticas aisladas, individuales más que en grupos (considerada leve); 2, fibras elastóticas intensamente agrupadas, formando masas fibrinoides (considerada moderada); 3, formando masas amorfas con pérdida de la estructura fibrilar (considerada intensa).
- Tipo celular (modificado de Viros *et al.* (15)): 1, células epitelioides; 2, células fusocelulares; 3 celularidad mixta.
- Pigmentación de los melanocitos (modificado de Viros *et al.* (15)): 0, no se visualiza pigmento o amelanóticos; 1, pigmentación moderada visible fácilmente a bajo aumento; 2, pigmentación intensa dificultando la visualización de los núcleos.

## 6.6. GENOTIPADO

### 6.6.1. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección de la mutación en el gen de BRAF

Se determinó por RT-PCR la presencia o ausencia de la mutación BRAF V600E en ADN extraído del tejido tumoral de los melanomas fijados en formol e incluidos en parafina con la prueba Cobas® 4800 BRAF V600 realizada con el sistema cobas, 4800, v2.0. La prueba de mutación está diseñada para detectar el cambio de un nucleótido (T1799A) en el gen BRAF que da como resultado una sustitución de valina por un ácido glutámico en el codón 600 (V600E) (126). Se basa en dos procesos:

- a. Obtención de ADN genómico para lo cual se preparan las muestras manualmente.
- b. Amplificación por PCR y detección del ADN diana utilizando cebadores y 2 sondas marcadas (una detecta la secuencia BRAF V600 nativa y la otra sonda la mutación V600E).

### 6.6.2. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección de otras mutaciones en el gen BRAF y NRAS

Se determinó por RT-PCR la presencia o ausencia de mutaciones en el exón 11 y 15 en el gen BRAF y en el exón 2,3 y 4 del gen NRAS desde el ADN extraído del tejido tumoral de los melanomas fijados en formol e incluidos en parafina. Igual que en el apartado previo, el procedimiento se basa en dos procesos: la preparación manual de la muestra para obtener ADN

genómico y la amplificación por PCR y detección del ADN diana. El ADN genómico se aísla con el kit de preparación de muestras de ADN de Cobas® (127).

Para la interpretación de los resultados es importante tener en cuenta que el resultado “mutación no detectada” no excluye la presencia de una mutación en las regiones de BRAF y/o NRAS, ya que los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutantes, la integridad adecuada de la muestra, la ausencia de inhibidores y de suficiente ADN para poder ser detectado.

## 6.7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

### 6.7.1. Análisis estadístico

El análisis se ha realizado usando el programa estadístico SPSS, versión 24.0 (SPSS, Chicago, IL) y el paquete ‘*survival*’, disponible en el software R, v 4.0.1.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables recogidas en el estudio. Las variables cuantitativas se han expresado como media  $\pm$  desviación típica (dt), mediana y rango. Las variables cualitativas se han expresado como frecuencia (n) y porcentaje. La comparación de medias entre dos grupos se realizó mediante la prueba T de Student o test de Mann-Whitney según procedió tras la comprobación de normalidad utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. La asociación entre variables cualitativas se estimó por medio del test estadístico Chi-cuadrado o test de Fisher según procedió.

Se determinó la SG, SEM, SLE y SLM de los pacientes, utilizando la metodología de Kaplan-Meier. Se presentó la mediana de supervivencia, junto con el intervalo de confianza (IC) correspondiente. La comparación de las curvas de supervivencia entre grupos se realizó a través de la prueba de rangos logarítmicos.

El estudio de los posibles factores de impacto en la supervivencia se realizó mediante regresión de riesgos proporcionales de Cox, ajustando por aquellas variables que resultaron significativas en el análisis univariante o clínicamente relevantes.

Se evaluó la capacidad predictiva del IB y la DB comparando los AUC de ambos índices. Se han aportado los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, con sus correspondientes IC al 95 %.

### 6.7.2. Inteligencia artificial

El análisis se ha realizado usando el lenguaje de programación “Python” y los paquetes LightGBM, XGBoost, PyTorch, shap, sklearn, pandas, numpy y matplotlib.

A partir de técnicas de IA hemos estimado la presencia de la mutación V600E de BRAF en 106 casos de melanoma creando un árbol de decisión que incluye variables clínicas e histológicas. Para su construcción hemos incluido variables discretas (edad, IB, IM) y categóricas (DB  $\geq$  o  $<$ 65 %, ulceración, nidos, contorno epidermis, forma celular, elastosis solar, dispersión intraepidérmica de melanocitos, pigmentación de los melanocitos, presencia de metástasis) descritas previamente en material y métodos (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros clínicos e histopatológicos incluidos para la construcción del árbol de decisión

Variable	Tipo	n (%)	Media $\pm$ dt	Mediana (rango)
Edad (años)	Discreta	106 (100)	61 $\pm$ 16.7	62 (26-98)
Estado mutacional de BRAF	Categórica			
Tipo nativo		78 (73.6)		
Mutación V600E		28 (26.4)		
Índice de Breslow (mm)	Discreta	106 (100)	1.9 $\pm$ 3.3	0.9 (0.2-26)
Índice mitótico (mitosis/mm <sup>2</sup> )	Discreta	106 (100)	2.2 $\pm$ 4.1	1 (0-26)
Densidad de Breslow (%)	Categórica	106 (100)	45.3 $\pm$ 34.8	40 (5-95)
<65 %		61 (57.5)		
$\geq$ 65 %		45 (42.5)		
Ulceración	Categórica			
Presente		15 (14.2)		
Ausente		91 (85.8)		
Nidos	Categórica			
Células sueltas		14 (13.9)		
<25 %		37 (36.6)		
26-49 %		21 (20.8)		
>50 %		29 (28.7)		
Epidermis	Categórica			
Atrófica		33 (27.3)		
Normal		23 (19)		
Hiperplásica		65 (53.7)		
Tipo celular	Categórica			
Epitelioide		71 (70)		
Fusocelular		8 (7.5)		
Mixto		27 (25.5)		
Elastosis solar	Categórica			
Presente		78 (73.6)		
Ausente		28 (26.4)		

Dispersión intraepidérmica de melanocitos	Categórica			
100 % en la basal		30 (29.7)		
>75-99 % en la basal		36 (35.6)		
50-75 % en la basal		22 (21.8)		
<50 % en la basal		13 (12.9)		
Pigmentación de los melanocitos	Categórica			
Amelanóticos		31 (29.3)		
Moderada		61(57.5)		
Intensa		14 (13.2)		
Metástasis	Categórica			
Presente		11 (10.4)		
Ausente		95 (89.6)		

Abreviaturas. dt: desviación típica

Previamente a la creación de árbol y con el objetivo de escoger las variables más importantes para el modelo, se seleccionaron los siguientes algoritmos de IA: XGBoost, Lightgbm y RNA.

Por otra parte, debido a la limitación de los datos se eligió la técnica de validación cruzada *Leave-one-out* (LOOCV), que evalúa el rendimiento y valida los modelos predictivos. Cada caso individual se utiliza como reserva para el conjunto de validación, entrenando n modelos, cada uno con un caso utilizado como validación. En este estudio, dispusimos de datos de 106 melanomas, por lo que se utilizaron 106 validaciones diferentes para evaluar los modelos de IA. Este proceso se repitió 1.000 veces para cada modelo de ML. Esta técnica es costosa desde el punto de vista computacional, pero permite maximizar los datos de entrenamiento y reducir el sesgo en la estimación del rendimiento del modelo (128).

Los modelos de ML son muy complejos en comparación con método estadísticos clásicos, como la regresión lineal, donde para cada variable existe un coeficiente. Durante mucho tiempo se les ha considerado cajas negras, ya que se conocen los datos de entrada al modelo y la respuesta que se obtiene, pero no cómo se ha llegado a ella. Es por ello que se han desarrollado técnicas de interpretabilidad para comprender su funcionamiento interno (129). Las explicaciones aditivas de SHapley (SHAP), desarrolladas por Lundberg y Lee (130), fue el método seleccionado en este caso. Dicha técnica nos ayuda a entender cómo son las relaciones entre las variables y la probabilidad de mutación predicha por el modelo.

Por último, se ha construido un árbol de decisión analizando los valores SHAP de cada característica y su contribución en la probabilidad de la presencia de mutación, unidos al conocimiento médico existente en esta área.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

De un total de 245 melanomas seleccionados, se excluyeron 139 (21 melanomas con metástasis en el momento del diagnóstico, 11 melanomas mucosos, 12 melanomas acrales y 95 melanomas in situ). Finalmente, se evaluaron 106 melanomas cutáneos invasivos. El seguimiento medio fue de 57 meses (rango, 10-83 meses).

En cuanto a las características generales de la población a estudio hubo un predominio del sexo femenino: 65 (61.3 %) fueron mujeres y 41 (38.7 %) hombres, con una edad media al diagnóstico de 61 años (Rango 26-98 años). La mayoría de los melanomas se localizaron en tronco (n= 37; 34.9 %) y el MES fue el subtipo histológico más frecuente (n= 77; 72.6 %), seguido del MN (n= 20; 18.9 %) y el LMM (n= 8; 7.5 %). Un caso (0.9 %) fue un melanoma nevoide. El espesor de Breslow osciló entre 0.2 y 26 mm, con una media de 1.9 mm. Sólo 15 lesiones mostraron ulceración (14.2 %). El estadio más frecuente fue el IA (n= 60, 56.6 %). Se realizó la técnica de la BSGC en 35 pacientes (33.7 %), con resultado positivo en 7 de ellos (20 %). La mutación BRAF V600E se evaluó en todos los pacientes, siendo positiva en 28 (26.4 %) y de tipo nativo en 78 (73.6 %). Los resultados se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Análisis descriptivo global

Variable	n (%)	Media $\pm$ dt	Mediana (Rango)
Edad (años)	106 (100)	61 $\pm$ 16.7	62 (26-98)
Sexo			
Hombre	41 (38.7)		
Mujer	65 (61.3)		
Localización			
Cabeza y cuello	25 (23.6)		
Tronco	37 (34.9)		
Extremidades inferiores	22 (20.8)		
Extremidades superiores	22 (20.8)		
Subtipo histológico			
Melanoma extensión superficial	77 (72.6)		
Melanoma nodular	20 (18.9)		
Léntigo maligno melanoma	8 (7.5)		
Otros	1 (0.9)		
Estadio según el AJCC			
IA	60 (56.6)		
IB	16 (15.1)		

II	21 (19.8)		
III	9 (8.5)		
Biopsia selectiva del ganglio centinela	35 (33.7)		
Positiva	7 (20)		
Negativa	28 (80)		
Estado mutacional de <i>BRAF</i>			
Tipo nativo	78 (73.6)		
Mutación V600E	28 (26.4)		
Índice de Breslow (mm)	106 (100)	1.9 ± 3.3	0.9 (0.2-26)
Densidad de Breslow (%)	106 (100)	45.3 ± 34.8	40 (5-95)
<65 %	61 (57.5)		
≥65 %	45 (42.5)		
Índice mitótico (mitosis/mm <sup>2</sup> )	66 (62.3)	2.2 ± 4.1	1 (0-26)
Ulceración			
Presente	15 (14.2)		
Ausente	91 (85.8)		
Nevo asociado			
Presente	23 (21.7)		
Ausente	83 (78.3)		
Elastosis solar			
Presente	78 (73.6)		
Ausente	28 (26.4)		

Abreviaturas. dt: desviación típica; AJCC: American Joint Committee on Cancer

La DB se evaluó en todos los melanomas, y osciló de 5 a 95 %, obteniendo una densidad media de 45 %. Al establecer un punto de corte superior o igual al 65 %, 45 melanomas (42.5 %) presentaron DB ≥65 % y 61 (57.5 %) melanomas DB <65 %. No hubo diferencias entre los dos grupos en relación a la edad (63.7 frente a 58.9 años;  $p=0.145$ ), pero se observó un predominio del sexo femenino entre aquellos pacientes con DB <65 % (70.5 % frente a 48.9 %;  $p<0.024$ ). El grupo con menor DB mostró más casos en estadios IA y IB (98.4 % frente a 35.6 %;  $p<0.001$ ) (tabla 3).

Las características de los melanomas asociados con DB ≥65 % incluyeron mayor IB (3.8 frente a 0.7 mm;  $p<0.001$ ) y mayor IM (4.5 frente a 0.5 mitosis/mm<sup>2</sup>;  $p<0.001$ ). En el grupo de melanomas de DB <65 % no hubo melanomas ulcerados, mientras que en el grupo de DB ≥65 % un 33.3 % de los melanomas presentaban ulceración (tabla 3).

**Tabla 3. Comparativa de las características clínico-patológicas entre melanomas con Densidad de Breslow <65 % y ≥65 %**

	Densidad de Breslow <65 % (n=61)		Densidad de Breslow ≥65 % (n=45)		<i>p</i> -valor
	n (%)	Media ± dt	n (%)	Media ± dt	
Edad (años)	61 (57.5)	58.9 ± 16.1	45 (42.4)	63.7 ± 17.3	0.145
Sexo					0.024
Hombre	18 (29.5)		23 (51.1)		
Mujer	43 (70.5)		22 (48.9)		

Localización					0.131
Cabeza y cuello	10 (16.4)		15 (33.3)		
Tronco	23 (37.7)		14 (31.1)		
Extremidad inferior	16 (26.2)		6 (13.3)		
Extremidad superior	12 (19.7)		10 (22.2)		
Estadio según el AJCC					<0.001
IA	53 (86.9)		7 (15.6)		
IB	7 (11.5)		9 (20)		
II	0 (0)		21 (46.7)		
III	1 (1.6)		8 (17.8)		
Subtipo histológico					-
Melanoma extensión superficial	55 (90.2)		22 (48.9)		
Melanoma nodular	1 (1.6)		19 (42.2)		
Léntigo maligno melanoma	5 (8.2)		3 (6.7)		
Otros	0 (0)		1 (2.2)		
Estado mutacional de <i>BRAF</i>					0.067
Tipo nativo	49 (80.3)		29 (64.4)		
Mutación V600E	12 (19.7)		16 (35.6)		
Índice de Breslow (mm)		0.7 ± 0.4		3.8 ± 4.5	<0.001
Índice mitótico (mitosis/mm <sup>2</sup> )		0.5 ± 0.7		4.5 ± 5.5	<0.001
Ulceración					<0.001
Presente	0 (0)		15 (33.3)		
Ausente	61 (100)		30 (66.7)		

Abreviaturas. dt: desviación típica; AJCC: American Joint Committee on Cancer

## 7.2. DENSIDAD DE BRESLOW COMO NUEVO FACTOR PRONÓSTICO EN MELANOMA.

El intervalo desde el diagnóstico de melanoma hasta el fallecimiento fue significativamente menor para los melanomas con DB  $\geq 65$  % (50.7 frente a 62.1 meses;  $p=0.002$ ). De los 18 (17 %) pacientes que fallecieron durante el seguimiento, 14 (77.8 %) presentaron DB  $\geq 65$  % ( $p=0.001$ ); y 8 (88.9 %) de los 9 pacientes que fallecieron específicamente por melanoma pertenecían al grupo DB  $\geq 65$  % ( $p=0.004$ ). Del grupo de 18 pacientes que sufrieron recaídas, 17 (94.4 %) estaban en el grupo DB  $\geq 65$  % mientras que solo 1 (5.6 %) estaba en el grupo DB  $< 65$  % ( $p<0.001$ ). Finalmente, 10 (90.9 %) de los 11 pacientes que desarrollaron enfermedad a distancia tenían DB  $\geq 65$  % ( $p=0.001$ ) (tabla 4).

Tabla 4. Comparativa pronóstica según la Densidad de Breslow

	Densidad de Breslow $< 65$ % (n=61)		Densidad de Breslow $\geq 65$ % (n=45)		p-valor
	n (%)	Media ± dt	n (%)	Media ± dt	
Meses desde diagnóstico hasta fallecimiento	61 (57.5)	62.1 ± 14.1	45 (42.4)	50.7 ± 20	0.002
Fallecidos					0.001
No	57 (64.8)		31 (35.2)		
Si	4 (22.2)		14 (77.8)		

Vivo/causa de la muerte					0.004
Vivo/Fallecido por otras causas	60 (61.9)		37 (38.1)		
Fallecido por melanoma	1 (11.1)		8 (88.9)		
Recaida					<0.001
No	60 (69)		27 (31)		
Si	1 (5.6)		17 (94.4)		
Enfermedad a distancia					0.001
No	60 (63.2)		35 (36.8)		
Si	1 (9.1)		10 (90.9)		

Abreviaturas. dt: desviación típica

La DB ha demostrado ser relevante a la hora de estimar las tasas de supervivencia de los pacientes con melanoma. La supervivencia media en nuestra serie fue de 73.61 meses (Rango: 69.56 - 77.65 meses). Se observa como la SG media es significativamente más corta en melanomas con DB  $\geq 65\%$  (65.1 frente a 78.8 meses;  $p=0.001$ ). En nuestra serie, la tasa de SLE, SEM y SLM a 5 años fue del 98.3 % para el grupo DB  $<65\%$ , disminuyendo al 59.9 %, 81.7 % y 74.1 % respectivamente para el grupo DB  $\geq 65\%$  ( $p<0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p<0.001$ ). En consonancia, los períodos de supervivencia media fueron mejores para pacientes con DB  $<65\%$  en relación a SLE (81.3 frente a 56.3 meses;  $p<0.001$ ), SEM (81.3 frente a 72.5 meses;  $p=0.001$ ) y SLM (81.3 frente a 66.4 meses;  $p<0.001$ ) (tabla 5, figuras 8-15).

**Tabla 5. Probabilidades de supervivencia**

	Tasas supervivencia	Tasas supervivencia en el grupo Densidad de Breslow $<65\%$	Tasas supervivencia en el grupo Densidad de Breslow $\geq 65\%$	<i>p-valor</i>
Supervivencia global (%)				
1 año	98.1	100	95.6	
5 años	83.7	93.4	70.3	
Media (IC 95 %)	73.6 (69.6-77.7)	78.8 (75.6-81.9)	65.1 (57.2-73)	0.001
Supervivencia libre de enfermedad (%)				
1 año	94.3	100	86.4	
5 años	82.5	98.3	59.9	
Media (IC 95 %)	71.2 (66.6-75.8)	81.3 (79.9-82.7)	56.3 (46.96-65.5)	<0.001
Supervivencia específica de melanoma (%)				
1 año	100	100	100	
5 años	91.7	98.3	81.7	
Media (IC 95 %)	78.5 (75.6-81.4)	81.3 (80-82.7)	72.5 (66-79)	0.001
Supervivencia libre de metástasis (%)				
1 año	94.1	100	93	
5 años	88.8	98.3	74.1	
Media (IC 95 %)	75.4 (71.7-79.1)	81.3 (79.9-82.7)	66.4 (57.9-74.8)	<0.001

Abreviaturas. IC: intervalo de confianza

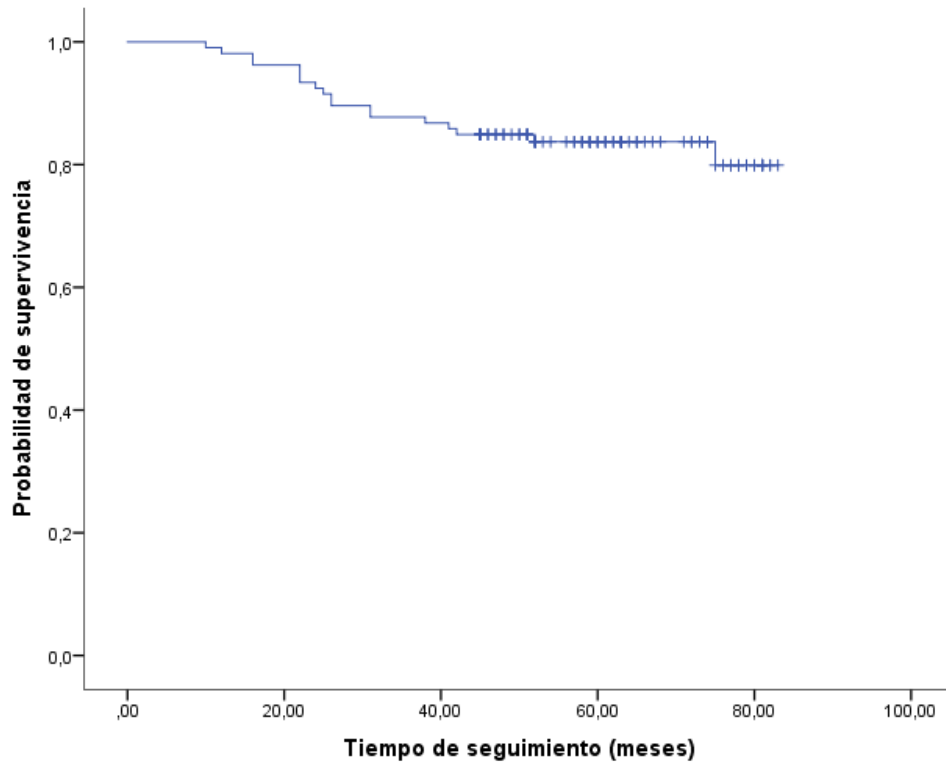


Figura 8. Supervivencia global

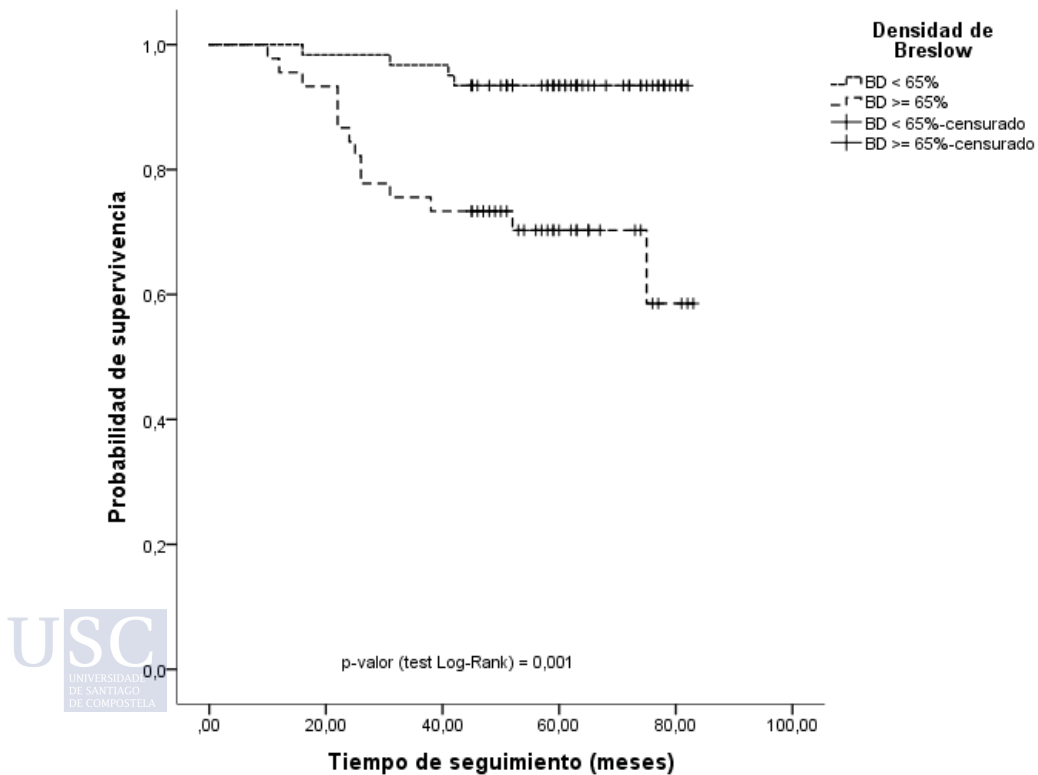


Figura 9. Supervivencia global estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 %

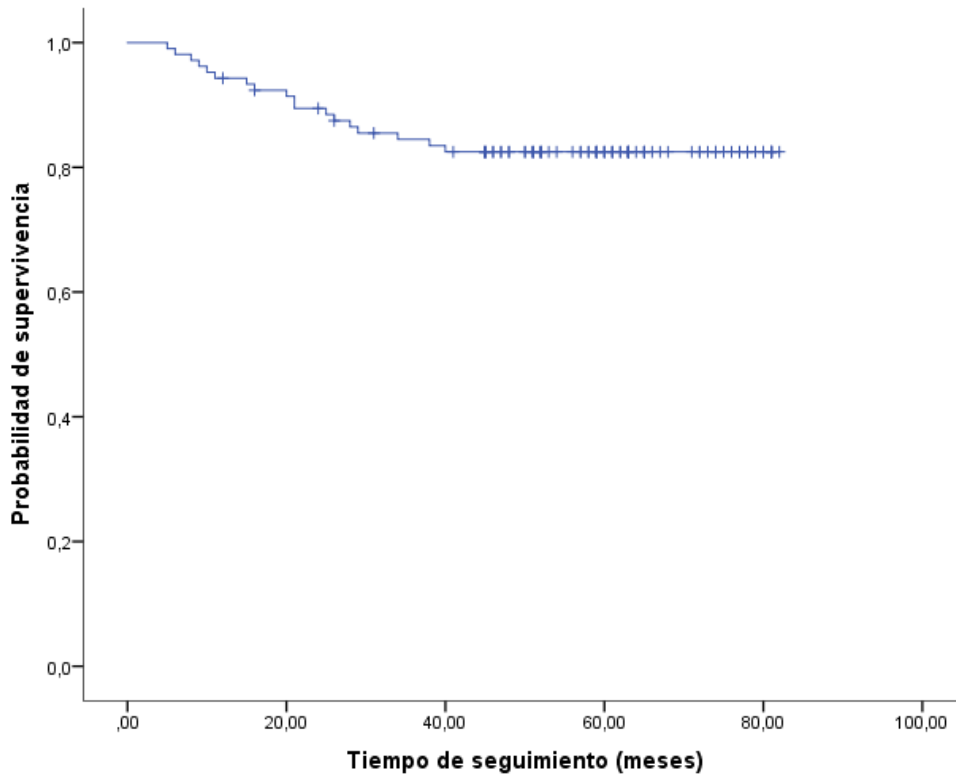


Figura 10. Supervivencia libre de enfermedad

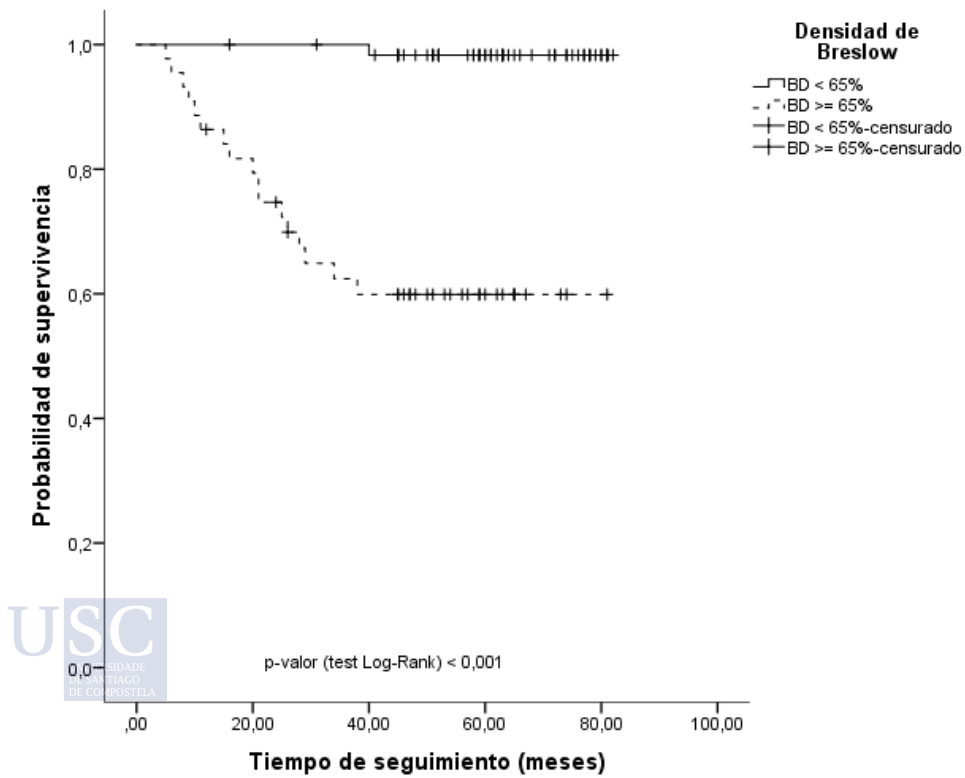


Figura 11. Supervivencia libre de enfermedad estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 %

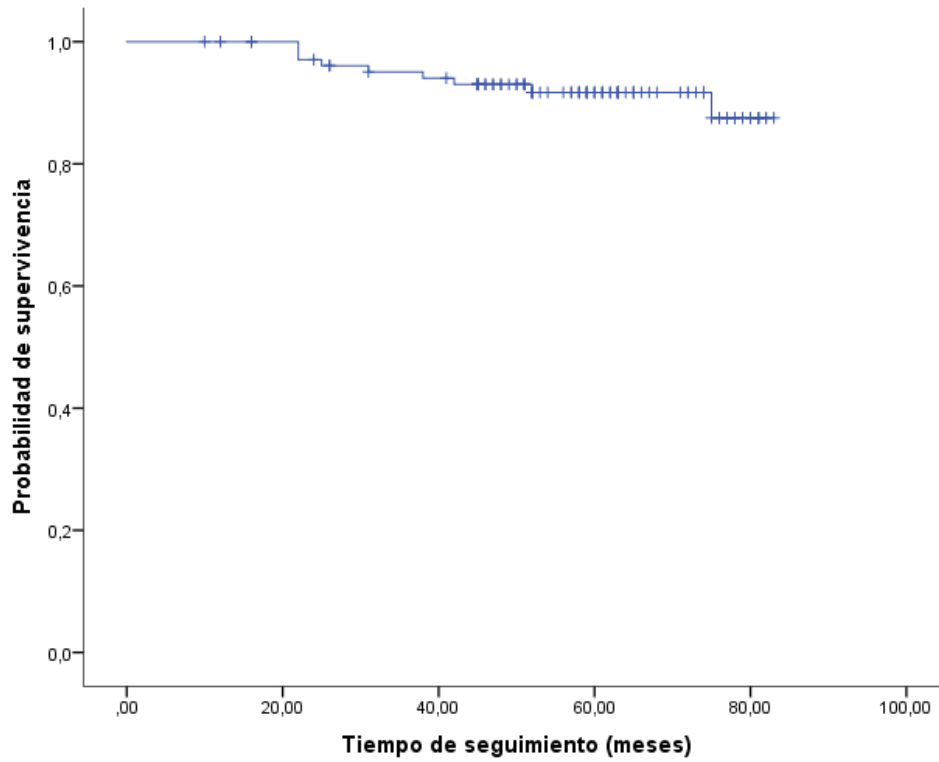


Figura 12. Supervivencia específica de melanoma

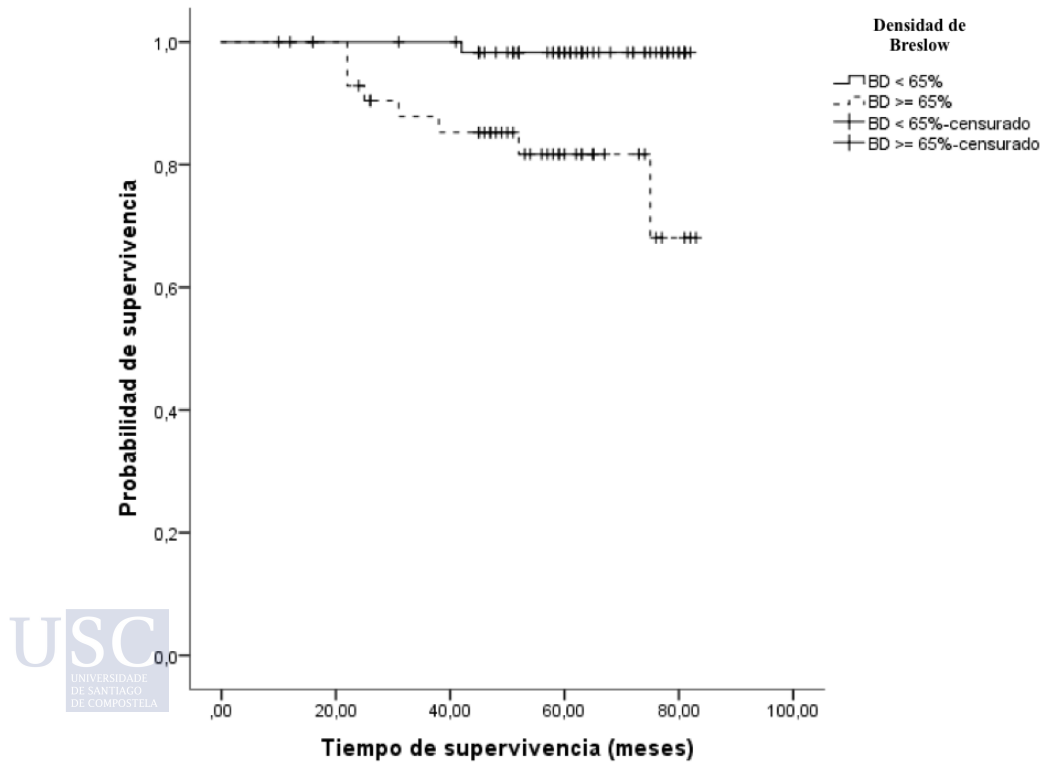


Figura 13. Supervivencia específica de melanoma estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 %

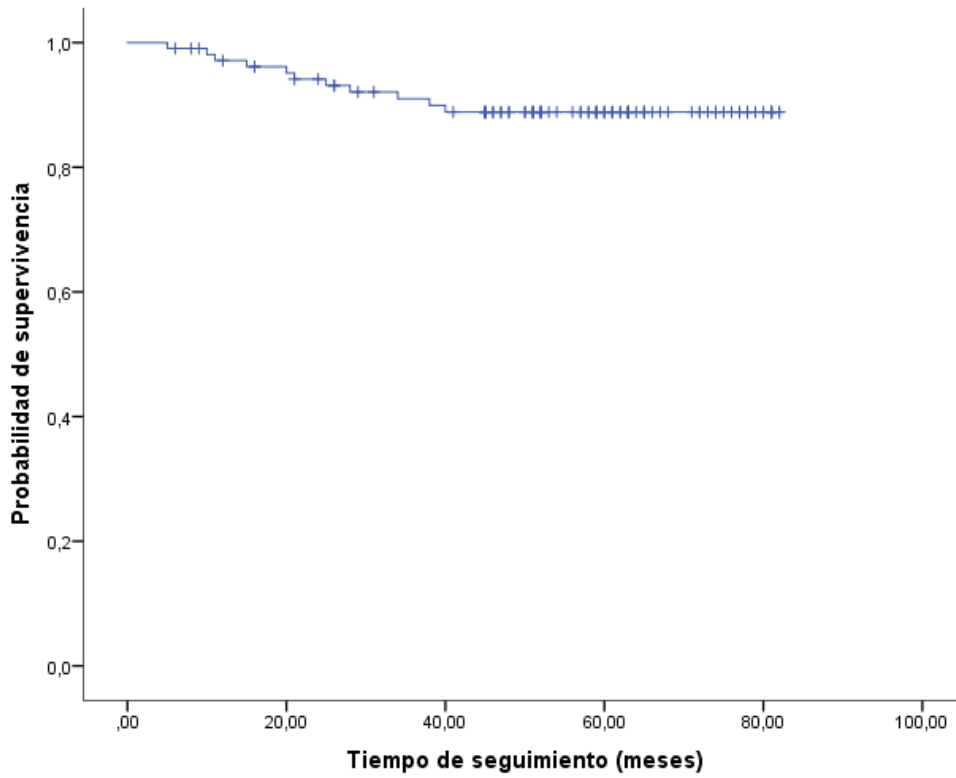


Figura 14. Supervivencia libre de metástasis

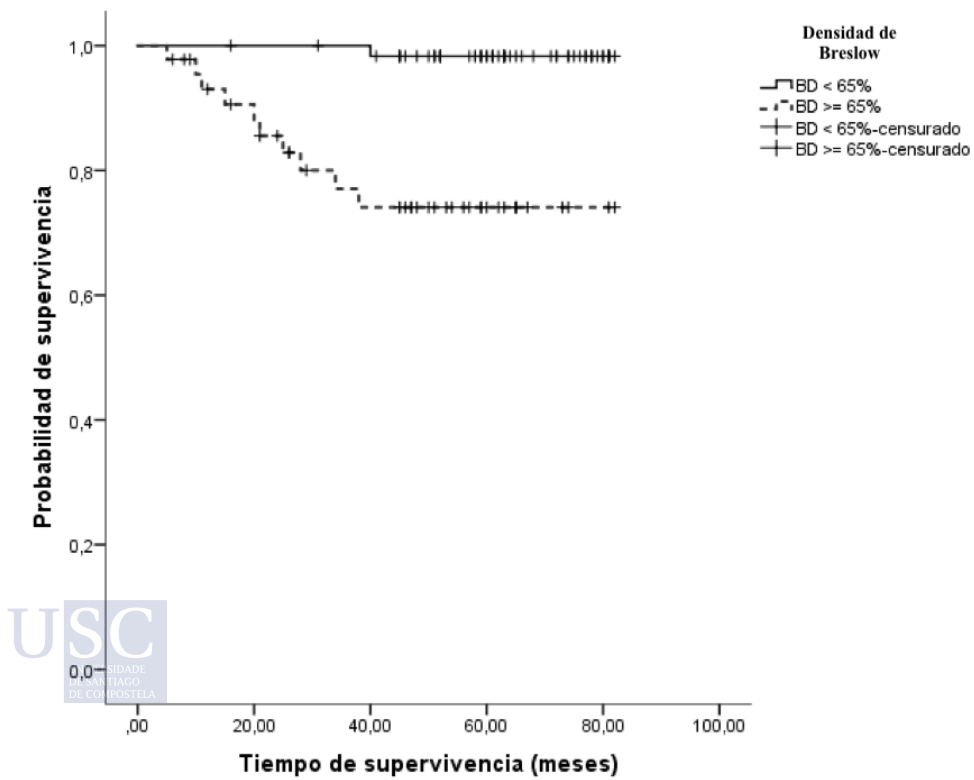


Figura 15. Supervivencia libre de metástasis estratificada según Densidad de Breslow <65 % o ≥65 %

Tras los análisis con los modelos de riesgo proporcional de Cox univariado y multivariado, seguimos obteniendo resultados a favor de la importancia de la DB como factor pronóstico. En el análisis univariado tanto el IB como la DB se asociaron con mayor riesgo de presentar los siguientes eventos analizados: SG (HR<sub>IB</sub> 1.13; HR<sub>DB</sub> 1.03), SLE (HR<sub>IB</sub> 1.22; HR<sub>DB</sub> 1.06), SEM (HR<sub>IB</sub> 1.17; HR<sub>DB</sub> 1.06) y SLM (HR<sub>IB</sub> 1.23; HR<sub>DB</sub> 1.04). En particular, las diferencias en la SG según la DB fueron más pronunciadas para el grupo DB ≥65 % en comparación con el grupo DB <65 % (HR 5.71; p=0.002) (tabla 6).

**Tabla 6. Análisis univariado de la influencia de los factores clínico-patológicos en la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia específica del melanoma y la supervivencia libre de metástasis utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox**

	No evento	Evento	HR (IC 95 %)	p-valor
<b>Supervivencia global</b>	<b>(n=88)</b>	<b>(n=18)</b>		
	Media ± dt	Media ± dt		
Edad (Años)	57.89 ± 15.04	76.06 ± 16.64	1.07 (1.03-1.11)	<0.001
Índice de Breslow (mm)	1.36 ± 1.57	5.06 ± 6.5	1.13 (1.06-1.19)	<0.001
Densidad de Breslow (%)	39.55 ± 33.71	73.33 ± 25.55	1.03 (1.01-1.05)	0.001
	n (%)	n (%)		
Densidad de Breslow				
<65 %	57 (64.8)	4 (22.2)	1	
≥65 %	31 (35.2)	14 (77.8)	5.71 (1.87-17.39)	0.002
Sexo				
Hombre	34 (38.6)	7 (38.9)	1.02 (0.39-2.63)	0.971
Mujer	54 (61.4)	11 (61.1)	1	
Localización				
Cabeza y cuello	18 (20.5)	7 (38.9)	1	
Tronco	32 (36.4)	5 (27.8)	0.46 (0.15-1.45)	0.186
Extremidades inferiores	18 (20.5)	4 (22.2)	0.59 (0.17-2.02)	0.402
Extremidades superiores	20 (22.7)	2 (11.1)	0.29 (0.6-1.38)	0.120
Estado mutacional de BRAF				
Tipo nativo	67 (76.1)	11 (61.1)	1	
Mutación V600E	21 (23.9)	7 (38.9)	1.84 (0.71-4.75)	0.208
<b>Supervivencia libre de enfermedad</b>	<b>(n=87)</b>	<b>(n=17)</b>		
	Media ± dt	Media ± dt		
Edad (Años)	59.46 ± 15.99	69.83 ± 17.00	1.04 (1.01-1.07)	0.008
Índice de Breslow (mm)	1.23 ± 1.41	5.06 ± 6.50	1.22 (1.14-1.31)	<0.001
Densidad de Breslow (%)	37.41 ± 32.69	81.94 ± 16.99	1.06 (1.03-1.09)	<0.001
	n (%)	n (%)		
Densidad de Breslow				
<65 %	60 (69)	1 (5.6)	1	
≥65 %	27 (31)	17 (94.4)	30.93 (4.11-232.81)	0.001

<b>Sexo</b>				
Hombre	32 (36.8)	8 (44.4)	1.38 (0.54-3.48)	0.501
Mujer	55 (63.2)	10 (55.6)	1	
<b>Localización</b>				
Cabeza y cuello	15 (17.2)	10 (55.6)	1	
Tronco	34 (39.1)	3 (16.7)	0.16	0.006
Extremidades inferiores	19 (21.8)	3 (16.7)	0.26	0.040
Extremidades superiores	29 (21.8)	2 (11.1)	0.18	0.029
<b>Estado mutacional de BRAF</b>				
Tipo nativo	67 (77)	10 (55.6)	1	
Mutación V600E	20 (23)	8 (44.4)	2.28 (0.89-5.77)	0.083
<b>Supervivencia específica de melanoma</b>				
	<b>(n=93)</b>	<b>(n=9)</b>		
	Media ± dt	Media ± dt		
Edad (Años)	59.89 ± 16.55	72.56 ± 14.54	1.06 (1.01-1.10)	0.016
Índice de Breslow (mm)	1.54 ± 1.90	6.81 ± 8.37	1.17 (1.08-1.26)	<0.001
Densidad de Breslow (%)	42.42 ± 34.42	76.11 ± 22.19	1.06 (1.03-1.09)	<0.001
	n (%)	n (%)		
<b>Densidad de Breslow (%)</b>				
<65 %	60 (61.9)	1 (11.1)	1	
≥65 %	37 (38.1)	8 (88.9)	13.89 (1.73-111.50)	0.013
<b>Sexo</b>				
Hombre	38 (39.2)	3 (33.3)	0.79 (0.19-3.16)	0.736
Mujer	59 (60.8)	6 (66.7)	1	
<b>Localización</b>				
Cabeza y cuello	23 (23.7)	2 (22.2)	1	
Tronco	35 (36.1)	2 (22.2)	0.64 (0.09-4.54)	0.654
Extremidades inferiores	19 (19.6)	3 (33.3)	1.53 (0.26-9.20)	0.640
Extremidades superiores	20 (20.6)	2 (22.2)	0.97 (0.14-6.85)	0.972
<b>Estado mutacional de BRAF</b>				
Tipo nativo	74 (76.3)	4 (44.4)	1	
Mutación V600E	23 (23.7)	5 (55.6)	3.73 (0.99-13.93)	0.051
<b>Supervivencia libre de metastasis</b>				
	<b>(n=95)</b>	<b>(n=11)</b>		
	Media±dt	Media±dt		
Edad (Años)	60.87±17.02	61.81±14.36	1.01 (0.97-1.05)	0.596
Índice de Breslow (mm)	1.67±2.97	4.81±4.58	1.23 (1.11-1.36)	<0.001
Densidad de Breslow (%)	41.47±34.13	78.18±20.53	1.04 (1.01-1.07)	0.10
	n (%)	n (%)		
<b>Densidad de Breslow</b>				
<65 %	60 (63.2)	1 (9.1)	1	
≥65 %	35 (36.8)	10 (90.9)	18.23 (2.33-142.81)	0.006

Sexo				
Hombre	36 (37.9)	5 (45.5)	1.40 (0.428-4.59)	0.577
Mujer	59 (62.1)	6 (54.5)	1	
Localización				
Cabeza y cuello	22 (23.2)	3 (27.3)	1	
Tronco	34 (35.8)	3 (27.3)	0.52 (0.10-2.56)	0.418
Extremidades inferiores	19 (20)	3 (27.3)	0.83 (0.17-4.13)	0.819
Extremidades superiores	20 (21.1)	2 (18.2)	0.56 (0.09-3.38)	0.530
Estado mutacional de BRAF				
Tipo nativo	74 (77.9)	4 (36.4)	1	
Mutación V600E	21 (22.1)	7 (63.6)	5.12 (1.49-17.52)	0.009

Abreviaturas. dt: desviación típica; HR: Hazard ratio; IC: intervalo de confianza

Se utilizó un modelo de regresión ajustado por edad, sexo, localización, estado mutacional de BRAF, IB y DB para identificar factores pronósticos independientes que influyen en la supervivencia de melanoma. Según el análisis multivariado solo la edad y la DB  $\geq 65$  % son factores pronósticos independientes para la SG con HR de 1.09 (IC 95 %: 1.03-1.16) y 11.76 (IC 95 %: 1.29-107.33) respectivamente. De igual modo, se demostró que la DB  $\geq 65$  %, pero no el IB, era un factor de mal pronóstico para SG, SLE y SLM. Los detalles del análisis multivariado se enumeran en la tabla 7.

Tabla 7. Análisis multivariado de riesgos proporcionales de Cox en relación con la supervivencia

	Supervivencia global		Supervivencia libre de enfermedad		Supervivencia específica de melanoma		Supervivencia libre de metástasis	
	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor	HR (IC 95 %)	p-valor
Edad (Años)	1.09 (1.03-1.16)	0.005	0.99 (0.96-1.04)	0.857	1.05 (0.99-1.11)	0.079	1.00 (0.96-1.05)	0.892
Sexo								
Hombre	0.42 (0.09-1.83)	0.061	0.17 (0.03-1.08)	0.249	0.71 (0.16-3.13)	0.651	1.26 (0.36-4.34)	0.716
Mujer	1		1		1		1	
Localización								
Cabeza y cuello	1		1					
Otras	7.76 (0.87-68.81)	0.066	1.34 (0.23-7.99)	0.748				
Estado mutacional de BRAF								
Tipo nativo	0.28 (0.04-1.94)	0.196	0.26 (0.04-1.81)	0.173	0.24 (0.05-1.15)	0.075	0.31 (0.79-1.22)	0.094
Mutación V600E	1		1		1		1	
Índice de Breslow (mm)	1.07 (0.98-1.18)	0.133	1.16 (1.03-1.3)	0.016	1.08 (0.97-1.20)	0.172	1.15 (0.97-1.28)	0.116

Densidad de Breslow								
<65 %	1		1		1		1	
≥65 %	11.76 (1.29-107.33)	0.029	1.17 (1.06-1.31)	0.003	6.73 (0.74-60.93)	0.090	1.04 (1.00-1.08)	0.033

Abreviaturas. HR: Hazard Ratio; IC: intervalo de confianza.

HR ajustados por edad, sexo, localización, estado mutacional de BRAF, índice de Breslow y Densidad de Breslow

### 7.3. CURVAS ROC: ÍNDICE DE BRESLOW Y DENSIDAD DE BRESLOW

Tras un seguimiento medio de 57 meses, cuando se analizaron el IB y la DB como factores predictores de SG (figura 16, tabla 8) surgieron algunas diferencias relevantes. El IB mostró un mayor valor de AUC (AUC=0.827) en comparación con la DB (AUC=0.576), encontrándose estas diferencias en el límite de significación (p=0.067).

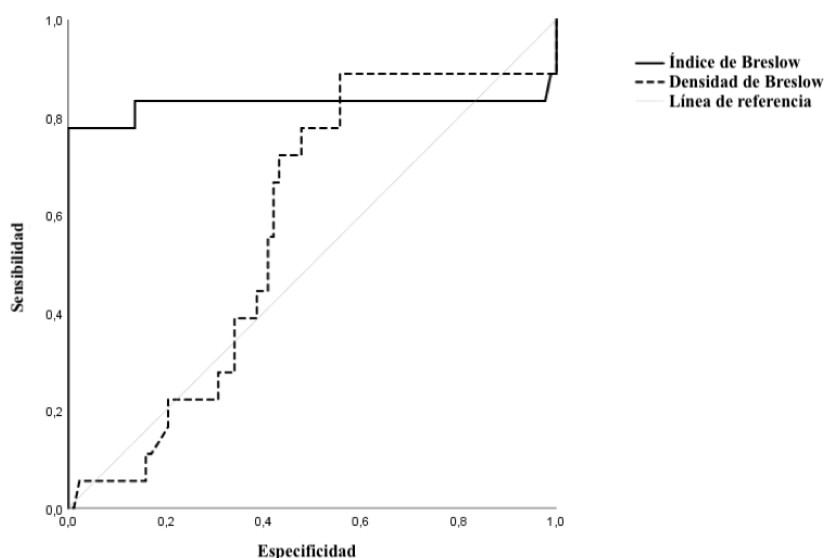


Figura 16. Curva ROC comparativa entre índice de Breslow y Densidad de Breslow. La línea continua hace referencia a la probabilidad de supervivencia estimada con el índice de Breslow. La línea discontinua hace referencia a la probabilidad de supervivencia estimada con la Densidad de Breslow

Tabla 8. Probabilidades de supervivencia estimadas con el índice de Breslow y con la Densidad de Breslow

	Probabilidad de supervivencia con IB	Probabilidad de supervivencia con DB	
	Estimación (IC 95 %)	Estimación (IC 95 %)	p-valor
AUC	0.827 (0.656-0.997)	0.576 (0.442-0.711)	0.067
Sensibilidad	0.778 (0.556-0.944)	0.889 (0.722-1.000)	
Especificidad	1.000 (1.000-1.000)	0.443 (0.340-0.545)	
VPN	0.956 (0.916-0.988)	0.952 (0.881-1.000)	
VPP	1.000 (1.000-1.000)	0.246 (0.200-0.298)	

Abreviaturas. AUC: área bajo la curva; IB: índice de Breslow; DB: Densidad de Breslow; IC: intervalo de confianza; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo

Por otra parte, la comparativa entre el IB frente a un modelo estimado combinando el IB y la DB ajustado por las covariables edad, sexo, localización y estado mutacional de BRAF (figura 17, tabla 9), mostró un AUC ligeramente superior para la combinación que para el IB en solitario ( $AUC_{IB}=0.827$  frente a  $AUC_{combinación}=0.837$ ), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.987$ ).

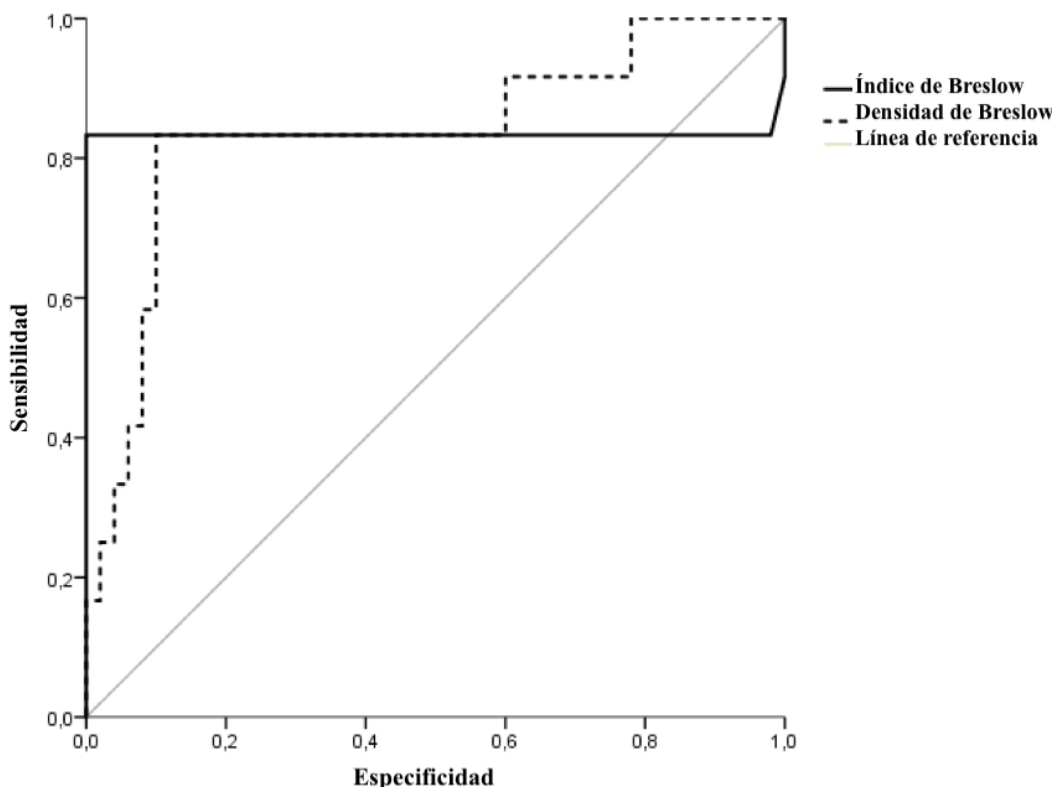


Figura 17. Curva ROC comparativa entre índice de Breslow y modelo (combinación de índice de Breslow y Densidad de Breslow, ajustado por las covariables edad, sexo, localización y estado mutacional de BRAF)

Tabla 9. Probabilidades de supervivencia estimadas con el índice de Breslow y con el modelo estimado combinado (combinación de índice de Breslow y Densidad de Breslow, ajustado por las covariables edad, sexo, localización y estado mutacional de BRAF)

	Probabilidad de supervivencia con IB	Probabilidad de supervivencia del modelo combinado	
	Estimación (IC 95 %)	Estimación (IC 95 %)	<i>p</i> -valor
AUC	0.827 (0.656-0.997)	0.837 (0.686-0.988)	0.987
Sensibilidad	0.778 (0.556-0.944)	0.833 (0.583-1.000)	
Especificidad	1.000 (1.000-1.000)	0.900 (0.800-0.980)	
VPN	0.956 (0.916-0.988)	0.958 (0.902-1.000)	
VPP	1.000 (1.000-1.000)	0.667 (0.500-0.900)	

Abreviaturas. AUC: área bajo la curva; IB: índice de Breslow; IC: intervalo de confianza; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo

#### 7.4. MUTACIÓN DE BRAF Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS MELANOMAS.

Se estudió el estado de BRAF en los 106 casos de melanoma, con presencia de la mutación de V600E en 28 melanomas (26.4 %). No se han demostrado diferencias significativas entre los melanomas con BRAF mutado y nativo en relación a la edad, sexo ni estadio del AJCC: los pacientes con mutación de BRAF presente fueron más jóvenes al diagnóstico (57.21 frente a 62.32 años en los no mutados). La distribución entre ambos sexos en relación a la mutación fue muy similar y no hubo diferencias entre mutados y no mutados en relación al estadio, aunque entre los melanomas de tipo nativo un 62.8 % de los pacientes fueron diagnosticados en estadio IA, frente a solo un 39.3 % de los pacientes con melanomas con BRAF mutado. Sí se han demostrado diferencias en relación a la localización, IB, IM y DB. En detalle, los melanomas mutados se localizaron con mayor frecuencia en tronco y extremidades, encontrando en cabeza y cuello un menor número de melanomas mutados ( $p=0.016$ ). También, se asociaron con un IB y un IM significativamente más altos (IB: 2.4 frente a 1.9 mm;  $p=0.012$ . IM: 3.2 frente a 1.8 mitosis/mm<sup>2</sup>;  $p=0.029$ ) con respecto a los melanomas sin mutación. No hubo diferencias con respecto a la ulceración. El porcentaje medio de DB fue mayor en pacientes con BRAF mutado (porcentaje medio de DB 58.6 % frente a 40.5 % en no mutados;  $p=0.032$ ).

Analizando las características morfológicas, el MES fue el subtipo histológico más frecuente (78.6 % en el grupo de BRAF mutado y 70.5 % en el grupo de tipo nativo), y destacamos que todos los LMM del estudio fueron de tipo nativo, aunque las diferencias fueron no significativas. La epidermis hiperplásica fue más frecuente entre los melanomas con mutación de BRAF presente (82.1 % frente a 53.8 %;  $p=0.008$ ) y se observó mayor dispersión intraepidérmica de los melanocitos entre los melanomas mutados (85.2 % frente a 64.9 %;  $p=0.048$ ). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en relación al estatus de BRAF y asociación con nevo, formación de nidos, elastosis solar (se observa una tendencia hacia una menor elastosis solar en los mutados, pero sin alcanzar significación estadística), circunscripción lateral, cantidad de pigmento, tipo celular ni presencia de linfocitos intratumorales.

El detalle de las características clínico-patológicas en relación a la mutación de BRAF se detallan en la tabla 10.

**Tabla 10. Comparativa de las características clínico-patológicas entre melanomas de tipo nativo y melanomas con mutación BRAF V600E**

Estado mutacional de BRAF V600E	Tipo nativo (n=78)		Mutación presente (n=28)		p-valor
	n (%)	Media ± dt	n (%)	Media ± dt	
Edad (años)		62.32 ± 17.58		57.21 ± 13.57	0.144
Edad fallecimiento	11 (10.4)	84.91 ± 16.17	7	68.29 ± 13.34	0.023
Sexo					0.707
Hombre	31 (39.7)		10 (35.7)		
Mujer	47 (60.3)		18 (64.3)		

Localización					0.016
Cabeza y cuello	22 (28.2)		3 (10.7)		
Tronco	30 (38.5)		7 (25)		
Extremidades inferiores	15 (19.2)		7 (25)		
Extremidades superiores	11 (14.1)		11 (39.3)		
Estadio AJCC					0.059
IA	49 (62.8)		11 (39.3)		
IB	12 (15.4)		4 (14.3)		
II	13 (16.7)		8 (28.6)		
III	4 (5.1)		5 (17.9)		
Subtipo histológico					-
Melanoma extensión superficial	55 (70.5)		22 (78.6)		
Melanoma nodular	15 (19.2)		5 (17.9)		
Léntigo maligno melanoma	8 (10.3)		0 (0)		
Otros	0 (0)		1 (3.6)		
Biopsia selectiva del ganglio centinela					<0.001
No realizada	60 (77.9)		9 (33.3)		
Realizada	17 (22.1)		18 (66.7)		
Ganglio afectado					1.000
No afectado	14 (82.4)		14 (77.8)		
Afectado	3 (17.6)		4 (22.2)		
Índice de Breslow (mm)		1.9 ± 3.4		2.4 ± 2.9	0.012
Densidad de Breslow (%)		40.5 ± 35.3		58.6 ± 29.9	0.032
Índice mitótico (mitosis/mm <sup>2</sup> )		1.8 ± 3.5		3.2 ± 5.4	0.029
Ulceración					0.535
Presente	10 (12.8)		5 (17.9)		
Ausente	68 (87.2)		23 (82.1)		
Nevo asociado					0.565
Presente	18 (23.1)		5 (17.9)		
Ausente	60 (76.9)		23 (82.1)		
Elastosis solar					0.233
Ausente	20 (25.6)		8 (28.6)		
Leve	30 (38.5)		12 (42.9)		
Moderada	13 (16.7)		7 (25)		
Intensa	15 (19.2)		1 (3.6)		

Dispersión intraepidérmica de melanocitos					0.267
100 % en la basal	26 (35.1)		4 (14.8)		
75-99 % en la basal	24 (32.4)		12 (44.4)		
50-74 % en la basal	15 (20.3)		7 (25.9)		
<50 % en la basal	9 (12.2)		4 (14.8)		
Dispersión intraepidérmica de melanocitos agrupada					0.048
100% en la basal	26 (35.1)		4 (14.8)		
<100% en la basal	48 (64.9)		23 (85.2)		
Nidos					0.655
Células sueltas	11 (14.9)		3 (11.1)		
<25%	29 (39.2)		8 (29.6)		
26-49%	15 (20.3)		6 (22.2)		
>50%	19 (25.7)		10 (37)		
Epidermis					0.026
Normal	21 (26.9)		2 (7.1)		
Atrófica	15 (19.2)		18 (17)		
Hiperplásica	42 (53.8)		23 (82.1)		
Epidermis agrupada					0.008
Normal/atrófica	36 (46.2)		5 (17.9)		
Hiperplásica	42 (53.8)		23 (82.1)		
Circunscripción lateral					0.537
Nítida	26 (33.3)		12 (44.4)		
Gradual	31 (39.7)		8 (29.6)		
Discontinua	21 (26.9)		7 (25.9)		
Pigmentación de los melanocitos					0.214
Amelanóticos	22 (28.2)		9 (32.1)		
Moderada	43 (55.1)		18 (62.3)		
Intensa	13 (16.7)		1 (3.6)		
Tipo celular					0.538
Epitelioide	50 (64.1)		21 (75)		
Fusocelular	6 (7.7)		2 (7.1)		
Mixto	22 (28.2)		5 (17.9)		
Linfocitos intratumorales					0.954
Ausentes	3 (3.8)		1 (3.6)		
Infiltración no intensa	63 (80.77)		22 (78.57)		
Infiltración intensa	12 (15.4)		5 (17.9)		

Abreviaturas. dt: desviación típica; AJCC: American Joint Committee on Cancer

**7.5. ESTIMAR LA MUTACIÓN DE BRAF A PARTIR DE TÉCNICAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL**

El mejor rendimiento entre los 3 algoritmos seleccionados se obtuvo con el XGBoost (AUC=0.704) (tabla 11, figura 18).

Tabla 11. Algoritmos de *Machine Learning* seleccionados y valores obtenidos para cada uno de ellos

	Sensibilidad $\pm$ dt	Precisión $\pm$ dt	Exactitud $\pm$ dt	AUC $\pm$ dt
XGBoost	0.882 $\pm$ 0.034	0.769 $\pm$ 0.0	0.740 $\pm$ 0.0	0.704 $\pm$ 0.019
LightGBM	0.713 $\pm$ 0.260	1 $\pm$ 0.0	0.798 $\pm$ 0.0	0.692 $\pm$ 0.025
RNA	0.468 $\pm$ 0.468	0.468 $\pm$ 0.033	0.713 $\pm$ 0.018	0.689 $\pm$ 0.03

Abreviaturas. dt: desviación típica; AUC: área bajo la curva; XGBoost: *Extreme Gradient Boosting*; LightGBM: *Light Gradient Boosting Machine*; RNA: Redes Neuronales Artificiales

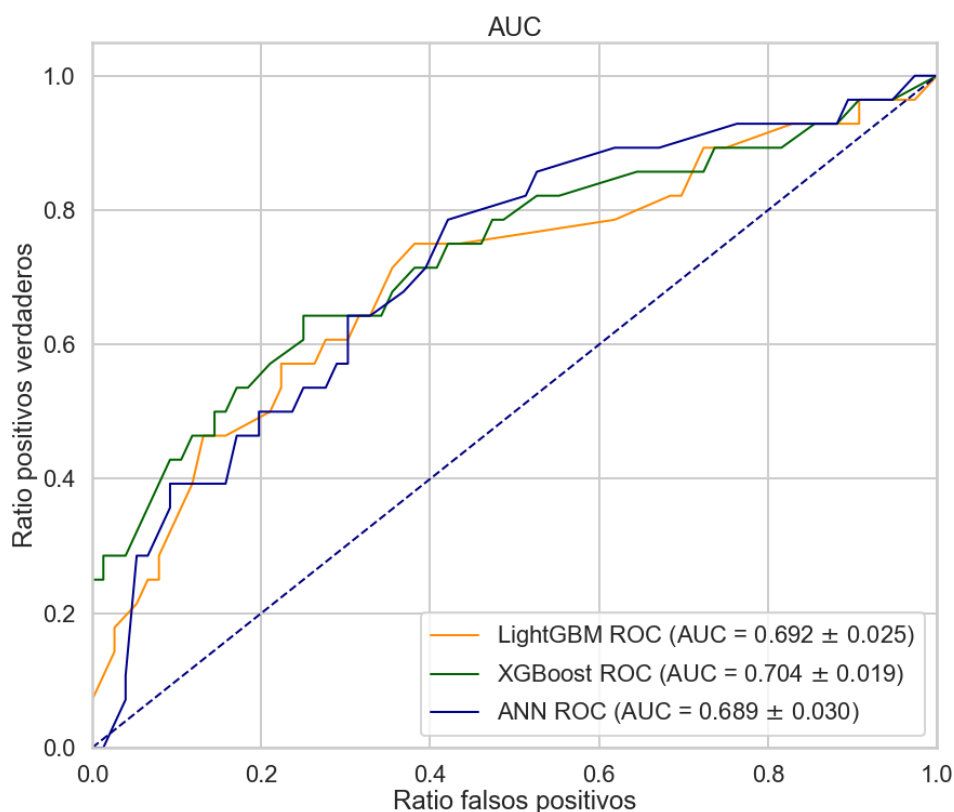


Figura 18. Comparación de las curvas ROC para los 3 algoritmos que muestra que XGBoost es el modelo con el mejor rendimiento



Según el modelo XGBoost las siguientes variables fueron las más importantes a la hora de predecir el estado mutacional de BRAF: presencia de metástasis, IB, DB, IM, epidermis hiperplásica, edad y nidos (figura 19).

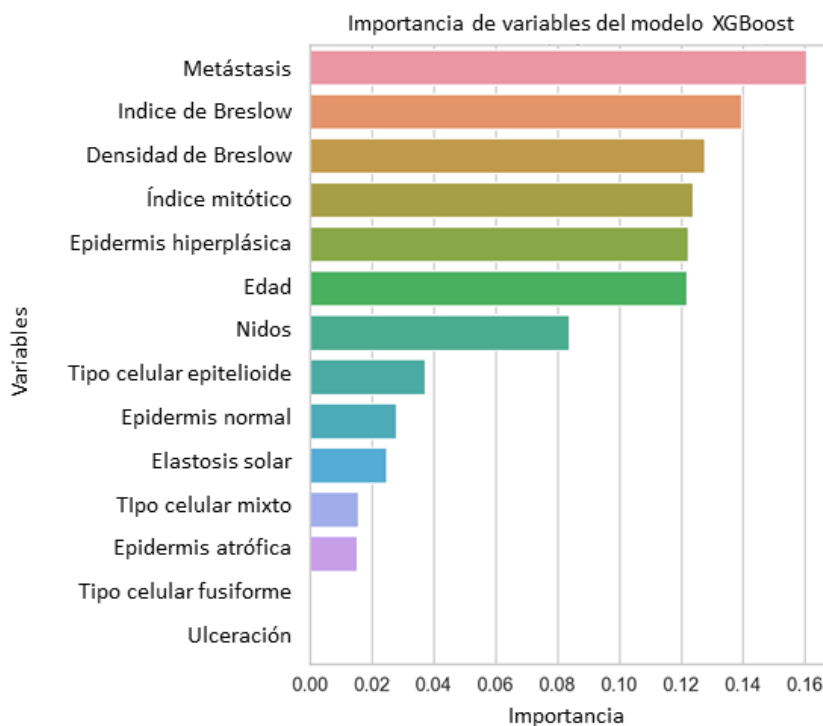
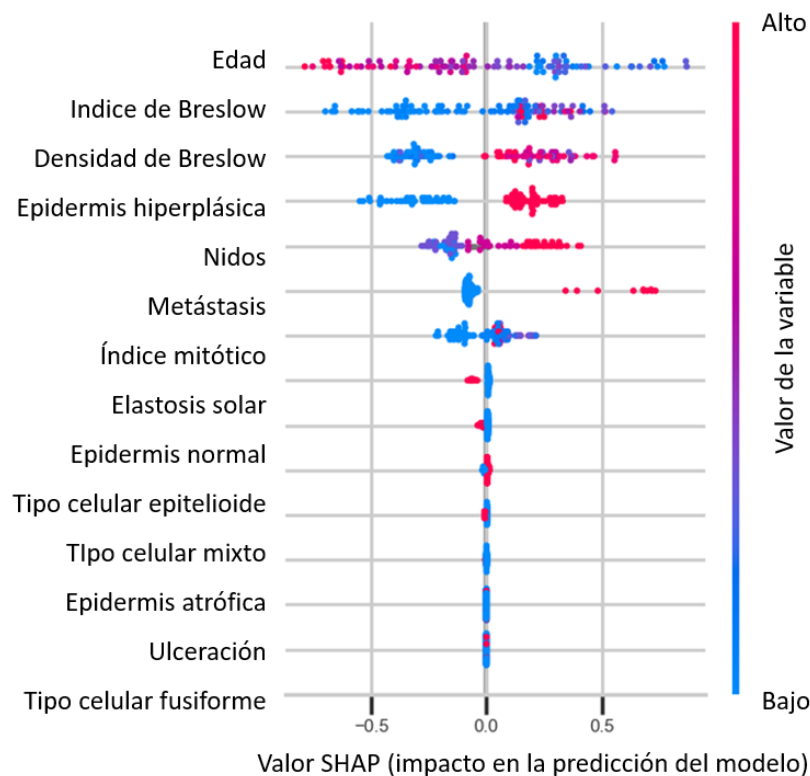


Figura 19. Importancia de las variables según el modelo XGBoost: Representada por la relevancia de cada variable normalizada entre 0 y 1

La importancia de cada característica extraída de los modelos ML solo representa el impacto relativo de cada una de ellas, pero no muestra qué tipo de correlación tienen. Por este motivo, se ha utilizado la técnica SHAP para interpretar la correlación de cada característica con la predicción resultante del modelo. En la figura 20 las variables están ordenadas según la importancia que representan. Cada punto representa a un paciente y se repite para cada característica. En el eje X se representa el impacto en la salida del modelo, a la izquierda hay valores negativos que representan una menor probabilidad de mutación y a la derecha valores positivos que representan una mayor probabilidad de mutación. El azul representa valores bajos de la variable y, por el contrario, el rojo representa valores altos.



**Figura 20. Explicaciones aditivas de SHapley**

Las variables más importantes se describen a continuación: la edad (los pacientes más jóvenes tienen más probabilidad de mutación), IB y DB (valores más altos implican más probabilidad de mutación), epidermis hiperplásica, alto grado de formación de nidos, presencia de metástasis e IM (valores altos de estas características representan una mayor probabilidad de mutación BRAF).

A partir de los resultados obtenidos con las técnicas anteriores, se construyó un árbol de decisión simple, basado en decisiones binarias dependiendo del valor de cada característica. Para ello se ha tenido en cuenta el conocimiento médico existente en referencia a la mutación de BRAF y su relación con características clínico-patológicas (figura 21). La interpretación del árbol se hace en sentido descendente. Se han utilizado solo 8 variables y 9 reglas binarias para estimar la presencia de la mutación BRAF V600E. La variable más importante para predecir los resultados es la DB.

Aplicado al conjunto de datos, el árbol logra un AUC de 0.848, con una precisión del 78.6%. Predice ausencia de mutación para 77 pacientes, siendo 71 verdaderos negativos y 6 falsos negativos. Predice mutación para 29 pacientes, siendo 22 verdaderos positivos y 7 falsos positivos.



## 8. DISCUSIÓN

A día de hoy el diagnóstico definitivo de melanoma se establece a través de la histología, y de su análisis se extraen numerosos factores pronósticos que ayudan a estimar la supervivencia en los pacientes. El IB y la ulceración son los más importantes, pero muchos otros parámetros clínicos e histológicos también han demostrado su valor pronóstico. Un ejemplo de ello son el IM y la presencia de regresión tumoral que aunque no incluidos en el sistema de estadificación del AJCC, tienen también relevancia pronóstica (55,61).

Estratificar correctamente a los pacientes según el riesgo de desarrollo de metástasis y su probabilidad de mortalidad es de vital importancia, de ahí que la identificación de nuevos factores pronóstico sea motivo de estudio constante. Se busca que sean sensibles, específicos, fácilmente analizables y que agreguen un valor añadido a los ya conocidos.

Por este motivo, nos gustaría resaltar el valor del análisis de la DB, aspecto estudiado en este trabajo. El término de DB fue introducido por Rashed (87) y Saldanha (88), y pretende evaluar el volumen tumoral como factor pronóstico. Los intentos anteriores de estimarlo han resultado tediosos y difíciles de implementar (79–86). El estudio de la DB surge a raíz de la idea de que su cálculo podría conducir a una mejor estimación del riesgo de progresión del melanoma y lo más importante, que podría implementarse fácilmente en la práctica diaria, ya que, a diferencia de los nuevos marcadores moleculares diagnósticos e identificadores de dianas terapéuticas, la DB se evalúa sin necesidad de ningún equipo adicional, en las mismas láminas de HE en las que se mide el IB, en apenas un minuto.

### 8.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

En nuestro estudio se han evaluado 106 melanomas malignos cutáneos invasivos, con un seguimiento medio de 57 meses. Los datos obtenidos en relación a la edad media de nuestros pacientes (61 años), la proporción en relación al sexo (61.3 % mujeres y 38.7 % hombres), la mayor frecuencia de melanomas localizados en tronco (n= 37; 34.9 %) y un mayor diagnóstico de pacientes en estadio IA (n= 60 melanomas, 56.6 %) están en consonancia con la mayoría de registros de melanoma (5,131). Se realizó la técnica de la BSGC en 35 pacientes (33.7 %), con una tasa de positividad del 20 % (n= 7), similar a otros estudios publicados (132).

En relación a las características histopatológicas, el MES fue el subtipo histológico más frecuente (n= 77; 72.6 %), al igual que en la mayoría de las publicaciones donde este subtipo es el más común a nivel mundial en raza caucásica. Los siguientes por orden de frecuencia fueron el MN (n= 20; 18.9 %) y el LMM (n= 8; 7.5 %), datos coincidentes con los del Registro Nacional de Melanoma (133). En nuestro estudio el IB medio fue de 1.9 mm, con una mediana de 0.9 mm. Además, la mayoría de las lesiones no estaban ulceradas (n= 91; 85.8 %) y 66

melanomas presentaban mitosis, siendo el IM medio de 2.2 mitosis por mm<sup>2</sup>. Melanoma asociado a nevo fue diagnosticado en 23 casos (21.7 %), cifra muy similar a la obtenida por Ackerman en 1988 tras estudiar una serie de más de 75.000 melanomas (134). Una reciente revisión de la literatura, que incluye 16.162 pacientes, cifra la proporción de melanomas asociados histológicamente a nevo en un 30 % y estos pacientes tendrían una edad más joven al diagnóstico, presencia de mayor número de nevos, antecedentes de quemaduras solares, localizados en tronco y zonas de exposición solar intermitente y con características histológicas de mejor pronóstico (menor IB y ausencia de ulceración) (135). La elastosis solar evaluada histopatológicamente es una señal de exposición solar crónica y es fácilmente demostrable en la piel adyacente al melanoma. La elastosis solar en diferentes grados (leve, moderada e intensa) estuvo presente en un 73.6 % de los melanomas (n= 78). Porcentaje superior al encontrado el estudio de Thomas *et al.* (75) con más de 3.000 participantes, donde también encuentran que la elastosis solar aumenta con la edad, sobre todo a partir de los 70 años. En contraposición, un estudio retrospectivo con pacientes de edades comprendidos entre 18 y 30 años identifica elastosis solar en solo un 3 % de los pacientes (136). Por otra parte, se ha observado que los melanomas que aparecen en piel expuesta al sol con poca elastosis solar (por exposiciones intermitentes) tienen alteraciones genéticas diferentes a aquellos que aparecen en piel con marcada elastosis solar (38).

## 8.2. RELACIÓN ENTRE LA DENSIDAD DE BRESLOW Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS MELANOMAS

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la DB y su asociación con características clínicas e histopatológicas. Se evaluó dicho parámetro en todos los melanomas incluidos, en las mismas láminas de HE en las que se midió el IB. No hubo que excluir ningún caso en relación a la medición de la DB. Se obtuvo una densidad media de 45.3 %, que osciló de 5 a 95 %.

En los 3 artículos publicados sobre DB los datos que obtuvieron fueron los siguientes:

- Rashed *et al.* (87): IB medio de 2.6 mm y DB media de 68.2 %. En su trabajo solo un 30 % de los pacientes se clasifican en estadio IA, pudiendo influir que un 76 % de sus casos presentan ulceración.
- Saldanha *et al.* (88): IB medio de 0.9 mm, una DB media de 60 % y presencia de ulceración en un 17.7 %.
- Secinti *et al.* (90): IB medio de 5 mm, una DB media de 70 % y presencia de ulceración en un 47.4 %. En su estudio se incluyen pacientes en estadio IV, pero no en estadio pT1 ni pT2.

Ante estos datos es difícil hacer comparaciones. En nuestro caso la mayoría de los pacientes se diagnosticaron en estadio IA (56.6 %), con un IB medio de 1.9 mm y solo un 14 % de los casos mostraron ulceración (frente a un 76 % de Rashed *et al.*(87)), este puede ser el motivo por el que nuestra DB media fuese menor. En relación a los casos de Saldanha *et al.* (88) obtienen una DB media más elevada que la nuestra (60 %), al igual que en el estudio de Secinti *et al.* (90), aunque en este último trabajo los autores excluyen melanomas en estadio pT1 y pT2 e incluyen pacientes en estadio IV, a diferencia de nuestro estudio y los de Rashed *et al.* (87) y

Saldanha *et al.* (88). Esto podría explicar el IB medio y la DB media tan elevada que presentan en su serie de casos.

Saldanha *et al.* (88) establecen un punto de corte de superior o igual a 65 % como criterio de selección de melanomas de mayor riesgo, con el que los pacientes podrían aumentar su estadio T de "a" a "b". El motivo de este punto de corte, lo avalan tras realizar diferentes modelos de regresión que incluían la DB con puntos de corte diferente (del 20 al 80 %, con incrementos de 5 en 5 %), el estadio T del AJCC y la SEM como objetivo. El mejor HR ajustado lo obtuvo el punto de corte  $\geq 65$  % (HR 2.03, IC 95 % 1.04-3.94;  $p=0.037$ ). Además, tiene como ventaja que es un punto de corte simple para el uso en la práctica diaria, recordando que, si la DB es 2/3 o más, el melanoma debe pasar a considerarse de alto riesgo. Esto podría ser especialmente relevante en los llamados “melanomas finos” (hasta 1 mm de espesor), para caracterizar el 1-15 % de los pacientes que eventualmente desarrollarán metástasis aun perteneciendo a estadios de mejor pronóstico (137).

En nuestro caso, estableciendo el mismo punto de corte ( $\geq 65$  %), encontramos que 61 (57.5 %) melanomas presentaron DB  $< 65$  % y los restantes 45 (42.5 %) DB  $\geq 65$  %.

La edad media entre los dos grupos fue muy similar: 58.9 años para el grupo DB  $< 65$  % y 63.7 años para el grupo de DB  $\geq 65$  %. Hubo diferencias en cuanto al sexo: el 70 % de las mujeres tenían DB  $< 65$  %, en comparación con solo el 30 % de los hombres. En referencia al melanoma, los hombres han mostrado consistentemente un peor pronóstico que las mujeres, pero las razones de esta discrepancia no son completamente entendidas (42). Scoggins *et al.* (43) concluyen que el género masculino está asociado con características tumorales desfavorables (aumento de IB, presencia de ulceración y regresión). La mayor DB entre los hombres podría ser un factor explicativo adicional.

También se encontraron diferencias significativas en relación al estadio del AJCC. Los melanomas con DB superior al 65 % se presentaron en estadios más avanzados (AJCC II y III;  $p<0.001$ ), con la consiguiente disminución de la supervivencia a 5 y 10 años que conlleva (55).

En relación a las características histopatológicas, los melanomas con DB  $\geq 65$  % presentaron IB mayor de 3 mm, todos los melanomas ulcerados pertenecieron a este grupo y presentaban un índice mitótico de más de 4 mitosis por  $\text{mm}^2$  (frente a  $< 1$  mitosis por  $\text{mm}^2$  en los melanomas con DB  $< 65$  %;  $p<0.001$ ). Como se ha comentado previamente el grosor tumoral, la ulceración y el IM se han correlacionado con un peor pronóstico (126,138,139). Estos hallazgos podrían contribuir a explicar el peor desenlace para los pacientes con DB  $\geq 65$  % que discutiremos más adelante: mayores tasas de recaída (de los pacientes que sufrieron recaída, el 94.4 % pertenecían al grupo DB  $\geq 65$  %;  $p<0.001$ ), aparición de enfermedad a distancia (el 90.9 % de los pacientes que la desarrollaron tenían DB  $\geq 65$  %;  $p=0.001$ ) y menor intervalo desde el diagnóstico hasta la muerte (51 frente a 62 meses;  $p=0.002$ ).

### 8.3. DENSIDAD DE BRESLOW Y ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA

El objetivo principal de este trabajo ha sido analizar la DB como nuevo factor pronóstico en melanoma. Su importancia en este sentido solo se ha investigado en 3 artículos previos y sus resultados respaldarían que la DB tiene un valor pronóstico real:

- Rashed *et al.* (87) demuestran que aunque fuertemente correlacionados, la DB es independiente del IB para determinar la SEM y la SG. Además, exploran la posibilidad de combinarlos lo que consigue una mejoría ligera en el AUC para la SG (AUC<sub>DB</sub> 89.6 %, AUC<sub>IB</sub> 94.8 %, AUC<sub>DB+IB</sub> 96.7 %) y la SEM (AUC<sub>DB</sub> 82.9 %, AUC<sub>IB</sub> 83.4 %, AUC<sub>DB+IB</sub> 86.8 %).
- Saldanha *et al.* (88) concluyen que la DB fue un factor pronóstico independiente para SG, SEM y SLM (HR<sub>SG</sub> 1.01, HR<sub>SEM</sub> 1.02, HR<sub>SLM</sub> 1.02; p<0.001) y en concreto, para la SEM fue mejor predictor que el IB. Estudian la combinación de la DB y el IB obteniendo una puntuación (DBxIB/100), con el objetivo de adjuntarlo como factor pronóstico complementario en el AJCC. Además, esta combinación podría corregir un posible defecto de la DB: cuando medimos el ancho del campo se corresponde con el objetivo de 10x, por lo que siempre tiene el mismo ancho (aproximadamente 2mm) pero la profundidad varía, y esto se corrige con la combinación de ambos parámetros.
- Secinti *et al.* (90) observan que el riesgo de mortalidad global aumenta a medida que lo hace la DB. En los estudios univariados para la SLE el riesgo aumenta con respecto al aumento del IB y la DB, obteniendo mejores HR el IB (HR<sub>IB</sub> 1.23 frente a HR<sub>DB</sub> 1.06).

En nuestro trabajo, una DB  $\geq 65$  % fue un factor de riesgo de recaída más temprana (56 frente a 81 meses en el grupo DB <65 %; p<0.001) y desarrollo precoz de metástasis (66 frente a 81 meses en el grupo DB <65 %; p<0.001); así como, un mayor riesgo de muerte específicamente por melanoma (72 frente a 81 meses en el grupo DB <65 %; p=0.001).

En referencia a la supervivencia a 5 años, nuestros resultados indican que los pacientes con mayor densidad tumoral (DB  $\geq 65$  %) obtienen significativamente peores datos de SG, SLE, SEM y SLM. En concreto, la SEM a 5 años disminuye notablemente con respecto a los pacientes con DB <65 % (de media, 17 meses de vida menos; p<0.001). Estos resultados apoyan la opinión expresada por Saldanha *et al.* (88) proponiendo la DB como un nuevo parámetro histológico a tener en cuenta con impacto en la supervivencia de los pacientes. En su estudio, divide en 3 grupos la DB ( $\leq 25$  %, 30-75 % y  $\geq 80$  %) obteniendo diferencias significativas para la SG, SEM y SLM, con peores resultados en la supervivencia a 5 años según aumenta la DB (SG a 5 años en los grupos descritos previamente de 0.93, 0.84 y 0.67; SEM a 5 años de 0.98, 0.94 y 0.80; y SLM a 5 años de 0.96, 0.87 y 0.67).

La DB fue un poderoso predictor de supervivencia entre los factores pronósticos examinados. Estos hallazgos se han confirmado tras el análisis con el modelo de riesgos proporcionales de Cox univariado y multivariado. En cuanto a los resultados del estudio univariado, la DB tiene un impacto significativo en las tasas de SG (HR 1.03, IC 95 % 1.01-1.05; p=0.001). Pero las diferencias son mayores si estratificamos: en los melanomas con DB  $\geq 65$ % el riesgo de muerte se multiplica por 5 (HR 5.71; IC 95 % 1.87-17.39; p=0.002). A la vista de estos resultados, se podría sugerir un seguimiento más estrecho en los pacientes diagnosticados de melanoma con mayor densidad tumoral.

Ampliando el estudio, en el análisis multivariado, la DB dicotomizada ( $\geq$  y <65 %) y la edad resultaron predictores altamente significativos para la SG, después de ajustar por todos los demás factores pronósticos. Además, la DB también tuvo impacto de manera significativa en

la SLE y SLM. Sin embargo, no fue así para la SEM, hecho que podría estar relacionado con el número reducido de casos o tratarse de una limitación propia de la DB.

Estos resultados se contraponen a los obtenidos en relación al IB, que no resulta significativo, al igual que ocurre en el trabajo de Secinti *et al.* (90), en donde tras el estudio multivariado solo la DB obtiene resultados significativos ( $HR_{DB}$  1.1;  $p=0.046$  frente a  $HR_{IB}$  1.78;  $p=0.094$ ). Esto podría indicar que la DB está agregando valor pronóstico en sí mismo, al menos en un subgrupo seleccionado de pacientes. Serán necesarios más estudios que incluyan un mayor número de pacientes y un seguimiento más prolongado para confirmar estos hallazgos.

#### 8.4. CURVAS ROC: ÍNDICE DE BRESLOW Y DENSIDAD DE BRESLOW

Al comparar las tasas de supervivencia estimadas con el IB y la DB mediante curvas ROC, se observa que la supervivencia estimada a través del IB ( $AUC=0.827$ ) es un mejor predictor de SG, a diferencia de la DB ( $AUC=0.576$ ), pero las diferencias no son significativas. Esto también ha sido indicado por Rashed *et al.* (87) quienes propusieron la combinación del IB y la DB para así mejorar el AUC (obteniendo una supervivencia estimada a los 5 años del 96.7 % para la combinación y del 94.8 % para el IB en solitario), lo que les ha permitido clasificar mejor los melanomas y discriminar la supervivencia a 5 años con mayor precisión. Por este motivo, hemos comparado el IB con un modelo combinado que incluye el IB y la DB (ambos como variables continuas), ajustados por las covariables edad, sexo, localización y estado mutacional de BRAF. La combinación mejora el AUC, aunque es muy similar al obtenido por el IB en solitario, lo que indica que ambas opciones tienen capacidades muy similares de predecir supervivencia. De todos modos, las diferencias entre ambos no son significativas ( $AUC_{IB}=0.827$  frente a  $AUC_{combinación}=0.837$ ;  $p=0.987$ ). Esto apunta hacia un potencial de combinación que tendrían el IB y la DB, que deberá estudiarse con mayor número de pacientes.

#### 8.5. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN DE BRAF Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS MELANOMAS

La mutación en el oncogén BRAF suele estar presente en un 40-60 % de los melanomas y es una mutación temprana en su desarrollo (17). Se ve con mayor frecuencia en pacientes jóvenes con MES y en localizaciones cutáneas expuestas intermitentemente al sol con poca elastosis solar (13,103). Aunque su presencia indica activación de la vía de las MAPK relacionada con proliferación, invasión y supervivencia tumoral, el rol exacto que ejerce su presencia en la progresión celular a melanoma todavía no está clara (92). La utilidad clínica de su determinación a día de hoy se debe a la existencia de fármacos inhibidores de BRAF, que solo se indican si el paciente es portador de la mutación. Se administran en conjunto con inhibidores de MEK, lo cual aumentan la supervivencia de los pacientes (106).

La incidencia de la mutación de BRAF en nuestra población fue menor que la reportada en la literatura: se determinó la presencia de la mutación de BRAF V600E en 28 melanomas (26.4 %), siendo la mayoría de tipo nativo ( $n=78$ ; 73.6 %). La variabilidad en el porcentaje de melanomas con BRAF V600E mutado las diferentes series puede deberse a múltiples factores:

variabilidad entre las diferentes poblaciones a estudio, diferente distribución de los subtipos histológicos incluidos, que los tumores estén en estadios más o menos avanzados, la mayor o menor frecuencia de elastosis solar y las diferentes metodologías empleadas para detectar las mutaciones.

Aunque no significativa, observamos una tendencia a una mayor incidencia de la mutación de BRAF entre los pacientes más jóvenes (57.21 años frente a 62.32 años en los no mutados). Es conocido que la presencia de la mutación de BRAF se correlaciona inversamente con la edad (15,38,102,103): es más frecuente en menores de 30 años, pero sólo el 25 % de los pacientes mayores de 70 años la presenta (140). Viros *et al.* (15) identifican la edad de 55 años como el factor predictivo de la mutación de BRAF más importante en su cohorte.

En cuanto a la localización, los melanomas de cabeza y cuello presentan la mutación BRAF V600E en menor porcentaje (solo un 10.7 % del total de los mutados;  $p=0.016$ ). Es conocido que los melanomas que aparecen en localizaciones de exposición crónica a la luz solar, como la cara, suelen aparecer en pacientes con edades avanzadas, con un desarrollo más lento, y las alteraciones genéticas que presentan difieren de las encontradas en piel sin daño actínico crónico. En contraposición, los melanomas que aparecen en piel expuesta intermitentemente a luz solar, como el tronco y extremidades, aparecen en pacientes más jóvenes y la presencia de la mutación de BRAF es mucho más frecuente (14,38,103). Maldonado *et al.* (38) distinguen si un melanoma aparece en zona de exposición solar crónica o no a través de la presencia o ausencia de elastosis solar (definida como una dermis con una decoloración gris azulada homogénea en secciones de HE). En nuestro análisis no se demostraron diferencias significativas en relación a la presencia/ausencia de mutación y la elastosis solar, aunque si se observó una tendencia hacia una mayor elastosis solar en los melanomas no mutados (elastosis solar intensa en un 19.2% frente a un 3.6 % en los melanomas mutados;  $p=0.233$ ), si bien, no alcanzó significación estadística. No obstante, señalamos como limitación que la elastosis solar sólo pudo evaluarse a nivel histológico, dado que por el carácter retrospectivo de nuestro estudio no se pudieron obtener datos en relación a los hábitos de exposición solar de nuestros pacientes, quemaduras solares en la infancia, ni tampoco los obtenidos a través de la exploración clínica (fototipo, número de nevos, presencia de léntigos solares y/o efélides, cáncer cutáneo no melanoma...).

No hemos demostrado diferencias entre los melanomas con BRAF mutado y no mutado en relación al sexo, tipo histológico ni estadio del AJCC. En concreto en relación al sexo la mayoría de los estudios no encuentran diferencias en este sentido (100,102,136). Teniendo en cuenta el subtipo histológico, hay trabajos que señalan mayor presencia de la mutación de BRAF entre los subtipos nodulares y de extensión superficial (38,102), pero en nuestro caso la distribución entre ambos grupos fue muy similar, con la particularidad, de que todos los LMM fueron de tipo nativo. Esto va en consonancia con otros estudios que indican que la clasificación exclusiva por subtipos histológicos del melanoma no tiene validez de cara al manejo de los pacientes y que una clasificación en función de la clínica, características histomorfológicas y moleculares aportaría más información (13,14). Y centrándonos en el estadio del AJCC, en nuestra serie las diferencias no fueron significativas, aunque entre los melanomas de tipo nativo un 62.8% de los pacientes fueron diagnosticados en estadio IA y un 5.1 % en estadio III, frente a solo un 39.3 % en estadio IA y 17.9 % en estadio III de los pacientes con melanomas con BRAF mutado. De acuerdo a esto, Shinozaki *et al.* (141) estudia la mutación de BRAF en melanomas primarios y metastásicos, concluyendo que su presencia puede ser indicativa de lesiones en estadios más avanzados y Ellerhorst *et al.* (104) observan que los pacientes

portadores de la mutación de BRAF tienen más probabilidad de presentarse en estadio III al momento del diagnóstico. A pesar de ello, no encuentran diferencias en la SG entre los pacientes en estadio III al estratificar según la presencia o ausencia de mutación (seguimiento medio de 39 meses).

La mayoría de los pacientes en los que se indicó la técnica de la BSGC tenían BRAF mutado (66.7 % frente a 33.3 %;  $p < 0.001$ ), pero tras su realización no se encontraron diferencias en relación a la presencia de metástasis ganglionares. Esto contrasta con Broekaert *et al.* (101) en su estudio de 365 pacientes con melanoma encuentran que los melanomas con BRAF mutado tienen más probabilidad de metastatizar a los ganglios linfáticos regionales. Y también con Viros *et al.* (15), que demuestra un patrón diferente de metástasis, con mayor afectación de ganglios linfáticos regionales en los pacientes con mutación de BRAF frente a los melanomas de tipo nativo, que suelen presentar metástasis satélite, en tránsito y viscerales con mayor frecuencia ( $p < 0.0001$ ).

Previamente, varios artículos han investigado la asociación entre las mutaciones de BRAF y diferentes características histopatológicas del melanoma para aclarar si cuando la mutación está presente los melanomas muestran un patrón diferencial (14,15,102). Conviene resaltar que en nuestro estudio los melanomas con BRAF mutado asociaron un IB y un IM significativamente más altos con respecto a los melanomas de tipo nativo, y no se encontraron diferencias en relación a la presencia o ausencia de ulceración. Esto último contrasta con los estudios de Ellerhorst *et al.* (104), Lu Si *et al.* (95) y García-Casado *et al.* (96) en los cuales los tumores portadores de la mutación de BRAF se muestran con mayor frecuencia ulcerados. De forma similar, hay diferentes publicaciones en las que se asocia la presencia de mutación de BRAF con características tumorales más agresivas, como mayor IB y mayor IM (96). Por el contrario, Liu *et al.* (102) tras estudiar 251 pacientes con melanomas invasivos primarios relaciona la presencia de la mutación BRAF con menor IB, menor IM, menor tasa de Mib-1 y de fosfohistona-3, asociando la presencia de mutación como indicativa de menor tasa de proliferación tumoral.

En referencia a la morfología, está descrito que los melanomas con mutación BRAF tienen una circunscripción lateral más nítida, muestran una epidermis hiperplásica, más dispersión intraepidérmica de melanocitos, mayor tendencia a formar nidos que a disponerse en células individuales y predominio de células más agrandadas, redondas y más pigmentadas (15,101,102). También se ha descrito que surgen en la piel no expuesta al sol de forma crónica con escasa elastosis solar (14,38,77). En nuestra serie no hubo diferencias en relación a la presencia de mutación de BRAF y presencia de nevo asociado, formación de nidos, circunscripción lateral (de nítida a discontinua), presencia de pigmento (de amelanótico a fuertemente pigmentado), tipo celular (epitelioide, fusocelular o mixto) ni presencia de linfocitos intratumorales. Sin embargo, fue significativa la forma de agrupación de los melanocitos: en los melanomas con BRAF mutado los melanocitos mostraron una mayor dispersión intraepidérmica, con un menor número de ellos en capas basales y la epidermis se mostró hiperplásica con mayor frecuencia. En conjunto, según nuestros resultados, el valor predictivo de las características histopatológicas por si solas no son lo suficientemente precisas para inferir el estado mutacional de BRAF.

## 8.6. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN DE BRAF Y LA DENSIDAD DE BRESLOW

Un hallazgo de este estudio es la asociación de la presencia de mutación de BRAF con la densidad tumoral. Los datos demuestran que los melanomas con BRAF mutado tienen una mayor densidad tumoral que aquellos con BRAF de tipo nativo (DB 58.7 % en melanomas con BRAF mutado frente a DB 40.5 % en melanomas de tipo nativo;  $p < 0.032$ ) (142). Esto podría ayudar a explicar por qué en diferentes trabajos se evidencia que los melanomas con mutación BRAF se asocian a un peor pronóstico (95–97). No hemos encontrado otras referencias al respecto sobre esto en la literatura, por lo que se abre la puerta a futuras investigaciones del posible vínculo entre estas dos características y su importancia pronóstica.

## 8.7. INTELIGENCIA ARTIFICIAL. CONSTRUCCIÓN DE UN ÁRBOL DE DECISIÓN PARA PREDECIR LA MUTACIÓN DE BRAF

En este trabajo, hemos adoptado una aproximación a la IA para predecir la mutación de BRAF utilizando datos clínicos e histopatológicos de los melanomas y, de este modo, seleccionar pacientes candidatos a terapia dirigida. Para ello hemos seleccionado 3 modelos (XGBoost, LightGBM y ANN) que se consideran de última generación y que han obtenido los mejores resultados para tratar este tipo de problemas (143). La mejor puntuación se obtuvo con el modelo XGBoost, aunque los resultados procedentes de los otros 2 algoritmos fueron similares. Las variables más relevantes para predecir las mutaciones BRAF fueron: presencia de metástasis, IB, DB, IM, epidermis hiperplásica, edad y formación de nidos. En general, estos resultados concuerdan con las características previamente conocidas de los melanomas con mutación BRAF, como se ha discutido en los apartados previos (8.5 y 8.6). En resumen, tienden a ocurrir en pacientes más jóvenes en áreas con exposición intermitente a la luz solar (38,103) y muestran características histopatológicas particulares, principalmente una alta tasa de formación de nidos e hiperplasia epidérmica reactiva (15). Según nuestros resultados, el IB también podría ser relevante, pero según las publicaciones revisadas la relación entre la presencia de un elevado IB y la probabilidad de mutación es controvertida (96,102,104). Resaltamos la posición de la DB, el nuevo parámetro que se estudia en este trabajo, ya que en todos los modelos de IA estudiados resulta como una variable relevante, al mismo nivel que otros factores pronóstico tan importantes como el IB o el IM. Aunque no se ha podido contrastar esto con la literatura, por ser la primera vez en la que se estudia la DB mediante técnicas de IA, reafirma la importancia de incluir esta variable en el estudio histopatológico de los melanomas.

Posteriormente se evaluó, con la técnica SHAP, cómo afecta cada variable en relación con la predicción, como se ha mostrado en la figura 20. El modelo toma todas las características usando una correlación no lineal y, en consecuencia, el mismo valor de una característica podría tener un impacto diferente dependiendo de los valores de las demás. Por ejemplo, los valores bajos de la DB (puntos azules en la tercera fila de la figura 20) están más concentrados en el lado izquierdo, lo que representa una menor probabilidad de mutación. Pero hay también algunos puntos azules en el lado derecho que representan una mayor probabilidad de mutación indicando la participación de otras variables que también son recogidas por el carácter no lineal del modelo.

Por otra parte, la técnica que se ha empleado para detectar mutaciones de BRAF merece una observación adicional: solo reconoce la mutación V600E, que es la mutación más común, pero no la única posible. Los 5 casos en los cuales el modelo predecía una mayor probabilidad de mutación de BRAF V600E, y que tras su determinación el resultado fue negativo, se analizaron con una técnica capaz de detectar todas las mutaciones descritas. Como resultado 4 de los 5 pacientes tenían otras mutaciones de BRAF (V600E/E2/D y K601E). Estas, aunque menos frecuentes, tienen las mismas consecuencias que la variante más común V600E. Esta es una limitación de este estudio, pero al mismo tiempo, podría tomarse como una prueba de la fortaleza del análisis, ya que los pacientes que repetidamente se clasificaban por los modelos de IA como altamente probables de ser portadores de la mutación, presentaban otras variantes de la mutación de BRAF, con lo cual los resultados del modelo serían mejorables con un estudio mutacional más amplio y un mayor número de pacientes.

En nuestro caso, hemos construido un árbol de decisión usando solo 8 variables (DB, tipo celular epitelioide, IB, formación de nidos, edad, epidermis hiperplásica, presencia de metástasis e IM) que obtiene un AUC de 0.848 con una precisión del 78.6%. En cuanto a la edad, la presencia de la mutación de BRAF es más frecuente en pacientes jóvenes y, concretamente, la media de edad de los pacientes con BRAF en múltiples estudios está entre los 50 y los 60 años, motivo por el cual el punto de corte de dicha variable se sitúa a los 60 años. En relación a la presencia de metástasis, en los diferentes modelos de IA es un parámetro relevante, incluido por tanto en el árbol de decisión, pero si la mutación de BRAF es un factor predictivo de metástasis continúa siendo un aspecto muy discutido en la literatura, como se ha comentado con anterioridad (104,141).

Excepto la edad y la presencia de metástasis, el resto de las variables seleccionadas en el árbol son características histopatológicas que ayudan a clasificar los melanomas y son relevantes desde el punto de vista pronóstico:

- La DB, variable principal de nuestro estudio, define el primer nodo de decisión y se ha asumido el punto de corte de  $DB \geq 65\%$  propuesto por Saldanha *et al.* (88).
- En nuestro estudio un IB y un IM elevados se asociaron con presencia de mutación de BRAF (cuya relación en la literatura es controvertida (96,102)). En los modelos de IA resultan como variables relevantes, y su valor elevado según las técnicas de interpretabilidad también se asoció con presencia de mutación.
- En referencia a la morfología celular epitelioide y tendencia a formar nidos, no se demostraron diferencias significativas en nuestra serie, pero es conocida la relación entre dichos aspectos morfológicos y la presencia de la mutación de BRAF (15,101,102); siendo dos variables importantes que actúan como nodos intermedios en el árbol creado.



La epidermis de los melanomas con mutaciones de BRAF está con mayor frecuencia engrosada (hiperplasia epidérmica), dicha característica se ha asociado con la presencia de la mutación de BRAF en nuestro estudio y en la literatura (15).

Cabe resaltar que este tipo de análisis no pretende reemplazar las técnicas IHQ ni los estudios moleculares previamente mencionados. Puede ser útil como metodología de cribado en los pacientes en los que se prevé la realización de pruebas moleculares específicas o para

ofrecer un resultado cuando tales técnicas no están disponibles, ya sea por limitaciones económicas u otras.

En resumen, no debe subestimarse el papel de la histopatología convencional. La capacidad de tomar decisiones de tratamiento relevantes con respecto a la terapia dirigida utilizando una prueba universalmente asequible y accesible, como la HE, sería de suma importancia en un momento en el cual métodos costosos y sofisticados apuntan en la misma dirección. Se demuestra que la IA puede ser útil para predecir el estado de BRAF incluso con un número reducido de casos.

## 8.8. LIMITACIONES

Una de las limitaciones de nuestro trabajo está en relación al diseño del estudio por su carácter retrospectivo y por desarrollarse en un único centro. También lo es el pequeño tamaño de la muestra que puede dificultar correlaciones clínico-patológicas precisas y el empleo de técnicas de IA; y a su vez, el bajo número de fallecimientos que se produjeron durante el seguimiento, que podrían restar valor en los estudios de supervivencia.

También, señalamos la dificultad a la hora de comparar nuestros resultados con otros estudios previos debido al número reducido de trabajos que evalúen la DB y, en los presentes, a las diferentes variables y objetivos analizados.

Hemos asumido el punto de corte de DB  $\geq 65$  % propuesto por Saldanha *et al.* (88) para estudiar los melanomas. Sería importante abordar en un futuro con una cohorte más amplia de pacientes si ese punto de corte propuesto es realmente el más adecuado para estratificar a los melanomas de más alto riesgo.

Por otra parte, nos gustaría destacar que este trabajo no pretende cuestionar la importancia crucial del IB como predictor pronóstico en melanoma, sino proponer la DB como un factor complementario a considerar, resaltando la importancia del cálculo del volumen tumoral.

## 9. CONCLUSIONES

La Densidad de Breslow es un marcador morfológico útil y fácilmente medible en el momento del examen histopatológico del melanoma y nos permite estimar el volumen tumoral.

La Densidad de Breslow es un buen predictor de mortalidad. Los melanomas con densidades tumorales elevadas se asocian a tasas de supervivencia más bajas y hemos demostrado que es un buen indicador de aumento de riesgo de recurrencia de melanoma y desarrollo precoz de metástasis. Esto viene determinado por un mayor índice de Breslow, mayor índice mitótico y mayor presencia de ulceración de los melanomas con Densidad de Breslow mayor o igual a 65 %.

Los pacientes con BRAF mutado presentan mayor densidad tumoral.

En relación al uso de la inteligencia artificial, entre los algoritmos seleccionados, el mejor rendimiento se obtuvo con XGBoost. Se ha demostrado la utilidad de herramientas de interpretabilidad, como SHAP, para crear un árbol de decisión con el objetivo de estimar la probabilidad de la presencia de la mutación de BRAF. Entre las variables clínicas e histopatológicas incluidas destacan la edad, el índice de Breslow y la Densidad de Breslow.

La inclusión de la Densidad de Breslow en el análisis del melanoma podría ser útil para una mejor estratificación pronóstica y mejorar el manejo de los pacientes en el futuro, proponiendo un seguimiento más estrecho en los pacientes con melanomas con mayor densidad tumoral dado su riesgo de muerte aumentado.



## 10. REFERENCIAS

1. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345–58.
2. Urteaga O, Pack G. On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 1966;19(5):607–10.
3. Vito WR, Vernon KS, Keiran SMS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res*. 2012;22(2):114–22.
4. American Cancer Society. Disponible en: <https://cancerstatisticscenter.cancer.org> [Internet].
5. Bethesda. SEER Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin. National Cancer Institute. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>. [Internet].
6. IARC: International Agency for Research on Cancer, WHO. GLOBOCAN 2022. Disponible en: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5) [Internet].
7. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I, *et al.* Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(4):318–28.
8. National Cancer Institute. SEER Program. Disponible en: [https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=53&data\\_type=2&graph\\_type=2&compareBy=sex&chk\\_sex\\_1=1&chk\\_sex\\_3=3&chk\\_sex\\_2=2&race=1&age\\_range=157&advopt\\_precision=1&advopt\\_](https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=53&data_type=2&graph_type=2&compareBy=sex&chk_sex_1=1&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&race=1&age_range=157&advopt_precision=1&advopt_). [Internet].
9. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005;41:45–60.
10. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):28–44.
11. Conforti C, Zalaudek I. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatol Pract Concept*. 2021;11:2021161S.
12. Schadendorf D, Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, *et al.* Melanoma. *Lancet*. 2018;392(10151):971–84.

13. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: An integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014;9(1):239–71.
14. Curtin J, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2135–47.
15. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, *et al.* Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med.* 2008;5(6):e120.
16. Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, *et al.* MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: A meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008;122(12):2753–60.
17. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949–54.
18. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: A meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2011;164(4):776–84.
19. Johansson M, Brodersen J, Gøtzsche PC, Jørgensen KJ. Screening for reducing morbidity and mortality in malignant melanoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;(6):1–32.
20. Pampena R, Kyrgidis A, Lallas A, Moscarella E, Argenziano G, Longo C. A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(5):938-945.e4.
21. Abbasi N, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, Mccarthy WH, Kopf AW. Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma. Revisiting the ABCD criteria. *JAMA.* 2004;292(22):2771–6.
22. Grob JJ, Bonerandi J. The “Ugly Duckling” sing: identification of the Common Characteristics of Nevi in an Individual as a Basis for Melanoma Screening. *Arch Dermatol.* 1998;134:103–4.
23. Pampena R, Lai M, Lombardi M, Mirra M, Raucci M, Lallas A, *et al.* Clinical and Dermoscopic Features Associated with Difficult-to-Recognize Variants of Cutaneous Melanoma: A Systematic Review. *JAMA Dermatology.* 2020;156(4):430–9.
24. Carrera C, Scope A, Dusza S, Giuseppe A, Nazzaro G, Phan A, *et al.* Clinical and dermoscopic characterization of pediatric and childhood melanomas. Multicenter study of 52 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78(1):278–88.
25. Thomas NE, Kricke A, Waxweiler WT, Dillon PM, Busam KJ, From L, *et al.* Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas a population-based study. *JAMA Dermatology.* 2014;150(12):1306–14.
26. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: A meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol.* 2008;159(3):669–76.

27. Carli P, De Giorgi V, Crocetti E, Mannone F, Massi D, Chiarugi A, *et al.* Improvement of malignant/benign ratio in excised melanocytic lesions in the “dermoscopy era”: A retrospective study 1997-2001. *Br J Dermatol.* 2004;150(4):687–92.
28. Salerni G, Carrera C, Lovatto L, Puig-Butille JA, Badenas C, Plana E, *et al.* Benefits of total body photography and digital dermoscopy (“two-step method of digital followup”) in the early diagnosis of melanoma in high-risk patients. *J Am Acad Dermatol.* 2013;67(1):1–21.
29. Ferrara G, Senetta R, Paglierani M, Massi D. Main clues in the pathologic diagnosis of melanoma: is molecular genetics helping? *Dermatol Ther.* 2012;25(5):423–31.
30. Prieto VG, Shea CR. Immunohistochemistry of melanocytic proliferations. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(7):853–9.
31. Weedon D. *Weedon’s Skin Pathology.* 2010.
32. Greenhaw BN, Covington KR, Kurley SJ, Yeniay Y, Cao NA, Plasseraud KM, *et al.* Molecular risk prediction in cutaneous melanoma: A meta-analysis of the 31-gene expression profile prognostic test in 1.479 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(3):745–53.
33. Elder DE, Massi D, Scolyer R WR. WHO Classification of Skin Tumours, Volume 11. In: *Skin tumours Pathology and genetics Lyon (France): IARC Press.* 2018. p. 240.
34. Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res.* 1969;29(3):705–27.
35. Scolyer RA, Long G V, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol.* 2011;5(2):124–36.
36. Sánchez Yus E, Herrera M, Simón RS, Requena L. Pero...¿hubo alguna vez una clasificación de Clark de los melanomas? *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101(1):19–30.
37. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, *et al.* The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med.* 2015;373(20):1926–36.
38. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, *et al.* Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(24):1878–90.
39. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma. Detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 2020;144(4):500–22.
40. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199–206.

41. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, *et al.* Prognostic factors analysis of 17.600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001;19(16):3622–34.
42. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7–34.
43. Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, *et al.* Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Ann Surg.* 2006;243(5):693–8.
44. Miller KD, Fidler-Benaoudia M, Keegan TH, Hipp HS, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(6):443–59.
45. Balch CM, Soong S jaw, Gershenwald JE, Thompson JF, Coit DG, Atkins MB, *et al.* Age as a Prognostic Factor in Patients with Localized Melanoma and Regional Metastases Data Management and Analysis Seng-jaw. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(12):3961–8.
46. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Disponible en: [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2016/results\\_merged/sect\\_16\\_melanoma\\_skin.pdf](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/results_merged/sect_16_melanoma_skin.pdf). 2019;2016. [Internet].
47. Del Fiore P, Russo I, Ferrazzi B, Monico AD, Cavallin F, Filoni A, *et al.* Melanoma in Adolescents and Young Adults: Evaluation of the Characteristics, Treatment Strategies, and Prognostic Factors in a Monocentric Retrospective Study. *Front Oncol.* 2021;11(September):1–7.
48. Iglesias-Pena N, Paradela S, Tejera-Vaquerizo A, Boada A, Fonseca E. Melanoma cutáneo en el anciano: revisión de un problema creciente. *Actas Dermosifiliogr.* 2019;110(6):434–47.
49. Puyana C, Rajkumar J, Tsoukas M. Primary Tumor Location Predicts Survival in Melanoma: A retrospective cohort study of 239.257 melanoma patients. *Skinmed.* 2021;19(4):288–96.
50. Hsueh EC, Lucci A, Qi K, Morton DL. Survival of patients with melanoma of the lower extremity decreases with distance from the trunk. *Cancer.* 1999;85(2):383–8.
51. Bello DM, Chou JF, Panageas KS, Brady MS, Coit DG, Carvajal RD, *et al.* Prognosis of acral melanoma: A series of 281 patients. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(11):3618–25.
52. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Thompson JF, Long G V., Ross MI, *et al.* Melanoma of the skin. In: Amin MB *et al.*, editor. *AJCC Cancer Staging Manual.* New York: Springer International Publishing; 2017. p. 563–585.
53. Tejera-Vaquerizo A, Fernández-Figueras MT, Santos-Briz Á, Ríos-Martín JJ, Monteagudo C, Fernández-Flores Á, *et al.* Protocolo de diagnóstico histológico para muestras de pacientes con melanoma cutáneo. Documento de consenso de la SEAP y la AEDV para el Registro Nacional de Melanoma. *Rev Española Patol.* 2021;54(1):29–40.

54. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970;172(5):902–8.
55. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long G V., Ross MI, *et al.* Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(6):472–92.
56. Nagore Enguídanos E, Martínez VO, Botella Estrada R, Insa Mollá A, Fortea Baixauli JM. Prognostic factors of localized malignant melanoma: study of 639 patients. *Med Clin (Barc).* 2005;124(10):361–7.
57. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(8):2105–10.
58. Zembowicz A, Kafanas A. Syringotropic melanoma: A variant of melanoma with prominent involvement of eccrine apparatus and risk of deep dermal invasion. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(2):151–6.
59. Tjarks BJ, Somani N, Piliang M, Bergfeld WF. A proposed classification for follicular involvement by melanoma. *J Cutan Pathol.* 2017;44(1):45–52.
60. Balch CM, Wilkerson J, Murad T, Soong S jaw, Ingalls A, Madox W. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer.* 1980;45(12):3012–7.
61. Clinical N, Guidelines P, Guidelines N. National Comprehensive Cancer Network. Melanoma: Cutaneous (Version 1.2022). Disponible en: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1492>. 2022; [Internet].
62. Slater D, Cook M. Standards and datasets for reporting cancers. Dataset for the histological reporting of primary cutaneous malignant melanoma and regional lymph nodes. *R Coll Pathol.* 2019;(February):1–35.
63. Marsch AF, McKee RM, Werbel T, Ruo B, Hinds BR. The Relationship Between Epidermal Mitotic Density, Atypical Mitotic Figure Density, Breslow Depth, Ulceration, and Dermal Mitotic Rate in Cutaneous Melanoma: A Retrospective Cohort Study. *Int J Surg Pathol.* 2021;29(6):592–9.
64. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, *et al.* Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: An analysis of patients in the multi-institutional american joint committee on cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):2199–205.
65. Saldanha G. A Novel Numerical Scoring System for Melanoma Tumor-infiltrating Lymphocytes Has Better Prognostic Value Than Standard Scoring. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(7):906–14.
66. Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer.* 1996;78(3):427–32.

67. Eriksson H, Frohm-Nilsson M, Järås J, Kanter-Lewensohn L, Kjellman P, Månsson-Brahme E, *et al.* Prognostic factors in localized invasive primary cutaneous malignant melanoma: results of a large population-based study. *Br J Dermatol.* 2015;172(1):175–86.
68. Xu X, Chen L, Guerry D, Dawson P, Hwang W, VanBelle P, *et al.* Lymphatic Invasion is independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(2):229.
69. Sahni D, Robson A, Orchard G, Szydlo R, Evans A V., Russell-Jones R. The use of LYVE-1 antibody for detecting lymphatic involvement in patients with malignant melanoma or known sentinel node status. *J Clin Pathol.* 2005;58(7):715–21.
70. Van S, Colman M, Thompson J, McCarthy S, Scolyer R. Angiotropism is an Independent Predictor of Local Recurrence and In-transit Metastasis in Primary Cutaneous Melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(9):1396–403.
71. Moy AP, Duncan LM, Kraft S. Lymphatic invasion and angiotropism in primary cutaneous melanoma. *Lab Invest.* 2016;97(2):1–12.
72. Hughes TM, Williams GJ, Gyorki DE, Kelly JW, Stretch JR, Varey AHR, *et al.* Desmoplastic melanoma: a review of its pathology and clinical behaviour, and of management recommendations in published guidelines. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2021;35(6):1290–8.
73. Maurichi A, Miceli R, Eriksson H, Newton-Bishop J, Nsengimana J, Chan M, *et al.* Factors affecting sentinel node metastasis in thin (T1) cutaneous melanomas: Development and external validation of a predictive nomogram. *J Clin Oncol.* 2020;38(14):1591–601.
74. Subramanian S, Han G, Olson N, Leong SP, Kashani-Sabet M, White RL, *et al.* Regression is significantly associated with outcomes for patients with melanoma. *Surgery.* 2021;170(5):1487–94.
75. Thomas NE, Krickler A, From L, Busam K, Millikan RC, Ritchey E, *et al.* Associations of cumulative sun exposure and phenotypic characteristics with histologic solar elastosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(11):2932–41.
76. Kvaskoff M, Pandeya N, Green AC, Perry S, Baxter C, Davis MB, *et al.* Solar elastosis and cutaneous melanoma: A site-specific analysis. *Int J Cancer.* 2015;136(12):2900–11.
77. Landi MT, Bauer J, Pfeiffer RM, Elder DE, Hulley B, Minghetti P, *et al.* MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science.* 2006;313:521–2.
78. Lee CC, Ho HC, Lee MS, Hsiao SH, Hwang JH, Hung SK, *et al.* Primary tumor volume of nasopharyngeal carcinoma: Significance for survival. *Auris Nasus Larynx.* 2008;35(3):376–80.
79. Gebhart W, Knobler R. Computer-assisted volumetric analysis of cutaneous malignant melanomas. *Am J Dermatopathol.* 1984;6:93–5.

80. Brandt Sørensen F. Objective histopathologic grading of cutaneous malignant melanomas by stereologic estimation of nuclear volume. Prediction of survival and disease-free period. *Cancer*. 1989;63(9):1784–98.
81. Friedman, R J; Rigel, D S; Kopf, A W; Grin, C M; Heilman, E; Bart, R S; Kamino, H; Harris, M N; Roses, D F; Postel AH. Volume of malignant melanoma is superior to thickness as a prognostic indicator. Preliminary observation. *Dermatol Clin*. 1991;9(4):643–8.
82. Binder M, Dolezal I, Wolff K, Pehamberger H. Stereologic estimation of volume-weighted mean nuclear volume as a predictor of prognosis in “thin” malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 1992;99(2):180–3.
83. Bahmer FA, Hantirah S, Baum HP. Rapid and unbiased estimation of the volume of cutaneous malignant melanoma using Cavalieri’s principle. *Am J Dermatopathol*. 1996;18(2):159–64.
84. Mossbacher U, Knollmayer S, Binder M, Steiner A, Wolff K, Pehamberger H. Increased nuclear volume in metastasizing “thick” melanomas. *J Invest Dermatol*. 1996;106(3):437–40.
85. Voss B, Wilop S, Jonas S, El-Komy MHM, Schaller J, Von Felbert V, *et al*. Tumor volume as a prognostic factor in resectable malignant melanoma. *Dermatology*. 2014;228(1):66–70.
86. Walton RG, Kim J, Velasco C, Swetter SM. Tumor volume: An adjunct prognostic factor in cutaneous melanoma. *Cutis*. 2014;94(5):226–30.
87. Rashed H, Flatman K, Bamford M, Teo KW, Saldanha G. Breslow density is a novel prognostic feature in cutaneous malignant melanoma. *Histopathology*. 2017;70(2):264–72.
88. Saldanha G, Yarrow J, Pancholi J, Flatman K, Teo KW, Elsheik S, *et al*. Breslow Density is a novel prognostic feature that adds value to melanoma staging. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(6):715–25.
89. Saldanha G, Yarrow J, Elsheikh S, O’Riordan M, Uraiby H, Bamford M. Development and initial validation of Calculated Tumor Area as a prognostic tool in Cutaneous Malignant Melanoma. *JAMA Dermatology*. 2019;155(8):890–8.
90. Secinti IE, Gursoy D, Erturk T, Dede I, Ozgur T, Dogan E. Should we report Breslow density , a new concept in cutaneous melanoma ? *Malays J Pathol*. 2021;43(3):397–404.
91. Safae Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, Saeedi A, Li G. The Prognostic Value of BRAF Mutation in Colorectal Cancer and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2012;7(10).
92. Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res*. 2006;16(2):97–103.
93. Cichowski K, Jänne P. Inhibitors that activate. *Nature*. 2010;464(18):358–9.

94. Vanni I, Tanda ET, Spagnolo F, Andreotti V, Bruno W, Ghiorzo P. The Current State of Molecular Testing in the BRAF-Mutated Melanoma Landscape. *Front Mol Biosci.* 2020;7:113(June):1–16.
95. Si L, Kong Y, Xu X, Flaherty KT, Sheng X, Cui C, *et al.* Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: Large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur J Cancer.* 2012;48(1):94–100.
96. García-Casado Z, Traves V, Bañuls J, Niveiro M, Gimeno-Carpio E, Jimenez-Sanchez A, *et al.* BRAF, NRAS and MC1R status in a prospective series of primary cutaneous melanoma. *Br J Dermatol.* 2015;172:1128–31.
97. Nagore E, Requena C, Traves V, Guillen C, Hayward NK, Whiteman DC, *et al.* Prognostic value of BRAF mutations in localized cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(5):858–62.
98. Long G V., Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, *et al.* Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1239–46.
99. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Groben PA, Parrish E, Krickler A, *et al.* Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. *JAMA Oncol.* 2015;1(3):359–68.
100. Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, Månsson-Brahme E, Platz A, Hansson J, *et al.* NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by prosequencing. *Melanoma Res.* 2006;16(6):471–8.
101. Broekaert SMC, Roy R, Okamoto I, Oord J Van Den, Bauer J, Manuscript A. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(6):763–70.
102. Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, *et al.* Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF T1799A (V600E) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):900–5.
103. Bauer J, Büttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis N a, Landi MT, *et al.* BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(2):345–51.
104. Ellerhorst J, Greene V. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in Primary Human Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(2):229–35.
105. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, *et al.* Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507–16.

106. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, *et al.* Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutated Melanoma . *N Engl J Med.* 2014;371(20):1867–76.
107. Jakob JA, Bassett RL, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, *et al.* NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer.* 2012;118(16):4014–23.
108. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, *et al.* Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436(7047):117–22.
109. Ramesh AN, Kambhampati C, Monson JRT, Drew PJ. Artificial intelligence in medicine. *Ann R Coll Surg Engl.* 2004;86(5):334–8.
110. Goodfellow I, Bengio Y, Courville A. Deep Learning [Internet]. MIT Press. 2016. 35–66 p.
111. Avila-Tomás JF, Mayer-Pujadas MA, Quesada-Varela VJ. La inteligencia artificial y sus aplicaciones en medicina I: introducción antecedentes a la IA y robótica. *Atención Primaria.* 2020;52(10):778–84.
112. Martorell A, Martin-Gorgojo A, Ríos-Viñuela E, Rueda-Carnero JM, Alfageme F, Taberner R. Inteligencia artificial en dermatología: ¿amenaza u oportunidad? *Actas Dermosifiliogr.* 2022;113(1):30–46.
113. Pastur-Romay LA, Cedrón F, Pazos A, Porto-Pazos AB. Deep artificial neural networks and neuromorphic chips for big data analysis: Pharmaceutical and bioinformatics applications. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences.* 2016.
114. Gu J, Taylor CR, Phil D. Practicing pathology in the era of big data and personalized medicine. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(1):1–9.
115. Geremek M, Szklanny K. Deep Learning-Based Analysis of Face Images as a Screening Tool for Genetic Syndromes. *Sensors (Basel).* 2021;21(19):6595.
116. Syrowatka A, Song W, Amato MG, Foer D, Edrees H, Co Z, *et al.* Key use cases for artificial intelligence to reduce the frequency of adverse drug events: a scoping review. *Lancet Digit Heal.* 2022;4(2):e137–48.
117. Chang WY, Huang A, Yang CY, Lee CH, Chen YC, Wu TY, *et al.* Computer-aided diagnosis of skin lesions using conventional digital photography: A reliability and feasibility study. *PLoS One.* 2013;8(11):e76212.
118. Li Y, Krahn J, Flake GP, Umbach DM, Li L. Towards predicting metastatic progression of melanoma based on gene expression data. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(4):453–63.
119. Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, Ko J, Swetter SM, Blau HM, *et al.* Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature.* 2017;542(7639):115–8.

120. Coudray N, Moreira AL, Sakellaropoulos T, Fenyö D, Razavian N, Tsirigos A. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using Deep Learning. *Nat Med.* 2018;24:1559–67.
121. Mehta M, Agrawal R, Rissanen J. SLIQ: A Fast Scalable Classifier for Data Mining. In: *International Conference on Extending Database Technology Springer Berlin Heidelberg.* 1996. p. 18–32.
122. Shafer J, Mehta M, Agrawal R. SPRINT: A Scalable Parallel Classifier for Data Mining. In: *Proceedings of the 22nd Very Large Data Bases Conference Mumbai.* 1996. p. 544–55.
123. Ke G, Meng Q, Finley T, Wang T, Chen W, Ma W, *et al.* LightGBM: A highly efficient gradient boosting decision tree. *Adv Neural Inf Process Syst.* :3149–57.
124. Lillicrap TP, Santoro A, Marris L, Akerman CJ, Hinton G. Backpropagation and the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2020;21(6):335–46.
125. Abbas O, Miller DD, Bhawan J. Cutaneous malignant melanoma: Update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol.* 2014;36(5):363–79.
126. Systems RM. Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test. 2011.
127. Systems RM. BRAF/NRAS Mutation Test (LSR).
128. Berrar D. Cross-validation. *Encycl Bioinforma Comput Biol ABC Bioinforma.* 2018;1–3:542–5.
129. Molnar C. Interpretable Machine Learning. A Guide for Making Black Box Models Explainable. 2020. 247 p [Internet].
130. Lundberg SM, Lee SI. A unified approach to interpreting model predictions. In: *31st Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS 2017), Long Beach, CA, USA.* 2017.
131. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the surveillance, epidemiology, and end results program. *J Invest Dermatol.* 2008;128(5):1340–2.
132. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, *et al.* Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;370(7):599–609.
133. Ríos N, Nagore E, López J, Redondo P, Marti R, Fernández-de-Misa R. Registro nacional de melanoma cutáneo. Características del tumor en el momento del diagnóstico: 15 años de experiencia. *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(9):789–99.
134. Ackerman A. What naevus is dysplastic, a syndrome and the commonest precursor of malignant melanoma? A riddle and an answer. *Histopathology.* 1988;13:241–56.

135. Martín-Gorgojo A, Nagore E. Melanoma asociado a nevo melanocítico. *Actas Dermosifiliogr.* 2018;109(2):123–32.
136. Estrozi B, Machado J, Rodriguez R, Bacchi CE. Clinicopathologic findings and braf mutation in cutaneous melanoma in young adults. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22:57–64.
137. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S j., Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199–206.
138. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, *et al.* Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: An analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):2199–205.
139. Eriksson H, Frohm-Nilsson M, Järås J, Kanter-Lewensohn L, Kjellman P, Månsson-Brahme E, *et al.* Prognostic factors in localized invasive primary cutaneous malignant melanoma: Results of a large population-based study. *Br J Dermatol.* 2015 Jan 1;172(1):175–86.
140. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, *et al.* Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3242–9.
141. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon D. Incidence of BRAF Oncogene Mutation and Clinical Relevance for Primary Cutaneous Melanomas. *Clin Cancer Res.* 2004;10(5):1753–7.
142. Figueroa-Silva O, Suárez-Peñaranda JM, Balboa-Barreiro V, Sánchez-Aguilar Rojas MD. Volume tumor impact on melanoma survival assessed using Breslow density. *J Am Acad Dermatol.* 2021;S0190-9622(21):01107–5.
143. Soofi A, Awan A. Classification Techniques in Machine Learning: Applications and Issues. *J Basic Appl Sci.* 2017;13(September):459–65.



## 11. ANEXOS

### ANEXO I. DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



#### DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

#### CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 15/03/2016 o estudo:

**Título:** Alteraciones citogenéticas del melanoma cutáneo y su correlación con las características clínico-patológicas

**Promotor:** José Manuel Suárez Peñaranda

**Tipo de estudo:** Outros

**Versión:** versión 1.0 de julio de 2015

**Código de Rexistro:** 2016/129

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e a Circular nº 07/2004, investigacións clínicas con produtos sanitarios.
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
C.H. Universitario de Santiago	José Manuel Suárez Peñaranda



En Santiago de Compostela, a 15 de marzo de 2016  
O secretario



Juan M. Vázquez Lago

**ANEXO II. CLASIFICACIÓN INTEGRADORA BASADA EN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2018)**

Modificado de Bastian *et al.* (33)

Grado de exposición a la RUV	Vía	Punto final de la vía	Neoplasia benigna	Melanocitomas y displasia de intermedio/bajo grado	Melanocitomas y displasias de intermedio/alto grado	Neoplasia malignas	Mutaciones comunes
Baja exposición a la RUV/DSA	I	Melanoma de extensión superficial / melanoma de bajo DSA	Nevos	Displasia de bajo grado	Displasia de alto grado/melanoma insitu	Melanoma de extensión superficial/ Melanoma de bajo DSA	BRAFV600E o NRAS TERT; CDKN2A; TP53, PTEN
				Nevos con inactivación de BAP-1	Melanocitoma con BAP-1 inactivado/ MELTUMP	Melanoma en nevos con inactivación de BAP-1	BRAF o NRAS + BAP1
				Nevos penetrante profundo	Melanocitoma penetrante profundo/ MELTUMP	Melanoma en nevos penetrante profundo	BRAF; MAP2K1 o NRAS + CTNNB1 o APC
					Melanocitoma epiteliode pigmentado/ MELTUMP	Melanoma en melanocitoma epiteliode pigmentado	BRAF; PRKAR1A o PRKCA
Alta exposición a la RUV/DSA	II	Léntigo maligno melanoma/ melanoma de alto DSA	? Proliferación melanocítica intraepidérmica sin atipia	? Proliferación melanocítica intraepidérmica atípica/displasia	Léntigo maligno	Léntigo maligno melanoma	NRAS; BRAF (no-V600E); KIT; o NF1 TERT; CDKN2A; TP53; PTEN; RAC1
	III	Melanoma desmoplásico	? Proliferación melanocítica intraepidérmica sin atipia	? Proliferación melanocítica intraepidérmica atípica/displasia	Melanoma insitu	Melanoma desmoplásico	NF1; ERBB2; MAP2K1; MAP3K1; BRAF; EGFR; MET TERT; NFKBIE; NRAS; PIK3CA; PTPN11
Baja o nula exposición a la RUV/DSA	IV	Tumor de Spitz maligno/ melanoma Spitzoide	Nevo de Spitz	Nevo de Spitz atípico (melanocitoma)	STUMP/MELTUMP	Tumor de Spitz maligno/ melanoma Spitzoide	HRAS; ALK; ROS1; RET; NTRK1; NTRK3; BRAF o MET CDKN2A
	V	Melanoma acral	? nevo acral	IAMP/displasia	Melanoma insitu acral	Melanoma acral	KIT; NRAS; BRAF; HRAS; KRAS; NTRK3; ALK; o NF1 CDKN2A; TERT; CCND1; GAB2
	VI	Melanoma mucoso	? melanosis	Melanosis atípica/ displasia/	Melanoma insitu de mucosas	Melanoma lentiginoso de mucosas	KIT; NRAS; KRAS; o BRAF NF1; CDKN2A;

				IAMPUS			SF3B1; CCND1; CDK4; MDM2
	VII	Melanoma sobre nevo congénito	Nevo congénito	Nódulo sobre nevo congénito (melanocito ma)	Melanoma insitu sobre nevo congénito	Melanoma sobre nevo congénito	NRAS; BRAFV600E (lesiones pequeñas) o BRAF
	VIII	Melanoma sobre nevo azul	Nevo azul	Nevo azul celular (melanocito ma)	Nevo azul celular atípico	Melanoma sobre nevo azul	GNAC; GNA11; o CYSLTR2 <i>BAP1; EIF1AX</i> ; <i>SF3B1</i>
	IX	Melanoma uveal					

Abreviaturas. RUV: radiación ultravioleta; DSA: daño solar acumulado; STUMP: tumor Spitzoide de potencial maligno incierto; MELTUMP: tumor melanocítico de potencial maligno incierto; IAMP: proliferación melanocítica intraepidérmica atípica; IAMPUS: proliferación melanocítica intraepidérmica atípica de significado incierto.

### ANEXO III. CLASIFICACIÓN TNM POR ESTADIOS DE LA 8ª EDICIÓN DEL *AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER*

Modificado de Gershenwald *et al.* (52)

T	Grosor	Ulceración
TX	No aplica	No aplica
T0	No aplica	No aplica
Tis	No aplica	No aplica
T1	≤ 1 mm	Desconocida o no especificada
T1a	< 0,8 mm	Sin ulceración
T1b	< 0,8 mm	Con ulceración
T1b	0,8-1 mm	Con o sin ulceración
T2	> 1-2 mm	Desconocida o no especificada
T2a	> 1-2 mm	Sin ulceración
T2b	> 1-2 mm	Con ulceración
T3	> 2-4 mm	Desconocida o no especificada
T3a	> 2-4 mm	Sin ulceración
T3b	> 2-4 mm	Con ulceración
T4	> 4 mm	Desconocida o no especificada
T4a	> 4 mm	Sin ulceración
T4b	> 4 mm	Con ulceración
<b>N</b>	<b>Número de ganglios linfáticos regionales afectados por el tumor</b>	<b>Presencia de metástasis en tránsito, satélites y / o microsátélites</b>
Nx	Ganglios linfáticos no determinados	No
N0	No se detectan metástasis regionales	No

N1	1 ganglio linfático afectado o en tránsito, satélites y/o microsátélites sin ganglios afectos	
N1a	1 ganglio clínicamente oculto	No
N1b	1 ganglio clínicamente detectado	No
N1c	No enfermedad regional linfática	Si
N2	2 o 3 ganglios o en tránsito, satélites y/o microsátélites con 1 ganglio afectado	
N2a	2 o 3 ganglios clínicamente ocultos	No
N2b	2 o 3 ganglios afectados, por lo menos 1 de ellos detectado clínicamente	No
N2c	1 ganglio clínicamente oculto o clínicamente detectado	Si
N3	≥ 4 ganglios afectados o en tránsito, satélites o microsátélites con ≥2 ganglios afectados, o cualquier número de ganglios afectos en mazacote, con o sin satélites o microsátélites	
N3a	≥ 4 ganglios clínicamente ocultos	No
N3b	≥4 ganglios, al menos 1 de ellos clínicamente detectado, o presencia de cualquier número de ganglios en mazacote ganglionar	No
N3c	≥2 ganglios clínicamente ocultos o clínicamente detectados o/y presencia de mazacote ganglionar	Si
<b>M</b>	<b>Sitio anatómico de metástasis</b>	<b>Nivel LDH</b>
M0	No metástasis a distancia	No aplica
M1	Evidencia de metástasis a distancia	
M1a	Metástasis a distancia a piel, partes blandas incluido músculo, y/o afectación linfática no regional	M1a: no recogida o no especificada M1a (0): no elevada M1a (1): elevada
M1b	Metástasis a pulmón con o sin metástasis M1a	M1b: no recogida o no especificada M1b (0): no elevada M1b (1): elevada
M1c	Metástasis visceral excluido el SNC con o sin metástasis M1a o M1b	M1c: no recogida o no especificada M1c (0): no elevada M1c (1): elevada
M1d	Metástasis a SNC con o sin metástasis M1a, M1b o M1c	M1d: no recogida o no especificada M1d (0): normal M1d (1): elevada

#### ANEXO IV. GRUPOS DE ESTADIO PRONÓSTICOS CLÍNICOS (CTNM) DE LA 8ª EDICIÓN DEL AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER

Modificado de Gershenwald *et al.* (52)

T	N	M	Estadio clínico AJCC
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB (IA*)
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Cualquier T, Tis	≥ N1	M0	III
Cualquier T	Cualquier N	M1	IV

Abreviaturas. AJCC: *American Joint Committee on Cancer*.

\*Nota: En la estadificación patológica tras la realización de una biopsia selectiva de ganglio centinela si es negativa un T1b pasa a ser IA por el mejor pronóstico, según la 8ª ed. de la estadificación del AJCC.

#### ANEXO V. GRUPOS DE ESTADIO PRONÓSTICOS PATOLÓGICOS (PTNM) DE LA 8ª EDICIÓN DEL AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER

Modificado de Gershenwald *et al.* (52)

T	N	M	Estadio patológico AJCC
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b, o N3c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a o N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c o N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB
T1a-T3a	N2c o N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Cualquier N ≥N1	M0	IIIC

T4b	N1a-N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Cualquier T, Tis	Cualquier N	M1	IV

Abreviaturas. AJCC: American Joint Committee on Cancer

## ANEXO VI. TABLA RESUMEN SOBRE APROXIMACIONES AL VOLUMEN TUMORAL EN MELANOMA

Autor y año	Medida para estimar volumen	Fórmula/método para su cálculo	Nº pacientes	Valor pronóstico y conclusiones
Secinti <i>et al.</i> (90), 2021	Densidad de Breslow	Método descrito por Rashed <i>et al.</i> (87)	19	DB como factor pronóstico independiente para SLE.
Saldanha <i>et al.</i> (89), 2019	Área tumoral calculada (ATC)	Fórmula: Altura × ancho de caja que incluya la totalidad del melanoma a partir del diámetro de las lentes del objetivo del microscopio × proporción (porcentaje ocupado por células de melanoma) dividido entre 100. Se mide en mm <sup>2</sup> .	1.239	Factor pronóstico superior a IB tras regresión de Cox. Melanomas con la misma clasificación T son muy heterogéneos si se clasifican según el ATC, por lo que con su uso se podría mejorar la precisión pronóstica.
Saldanha <i>et al.</i> (88), 2018	Densidad de Breslow	En la misma zona de medición del IB se proyecta una ventana (límite superior: membrana basal, límite inferior: célula más profunda de melanoma, ancho campo de aumento 10x) que se mueve lateralmente hasta encontrar la zona con mayor densidad celular. Se expresa en porcentaje. Cálculo de la "puntuación de Breslow": IB × DB/100.	1.329	Punto de corte de DB superior al 65 % para estratificar a los pacientes de más alto riesgo. DB predice SG; SEM y SLM y DB explica mejor la SEM que IB solo.
Rashed <i>et al.</i> (87), 2017			100	DB factor pronóstico independiente para la SG y SEM. Combinación de IB y DB permitiendo clasificar mejor los melanomas y discriminar con mayor precisión la supervivencia a 5 años.
Walton <i>et al.</i> (86), 2014	Volumen tumoral	Fórmula: Longitud × ancho antes de la biopsia escisional/extirpación × IB. Se mide en mm <sup>3</sup> .	108	Punto de corte de 250 mm <sup>3</sup> predice metástasis en el ganglio centinela. IB supera al volumen tumoral como indicador pronóstico.
Voss <i>et al.</i> (85), 2014	Volumen tumoral logarítmico	Fórmula: $\pi/12 \times \text{diámetro } a \times \text{diámetro } b \times \text{grosor del tumor de Breslow}$ . Se mide en mm <sup>3</sup> .	122	Punto de corte > 140 mm <sup>3</sup> indica peor pronóstico. Melanomas con volumen < 140 tuvieron mejor SLE a 5 años que los más grandes (98 frente a 47 %; p < 0.0001). Melanomas con bajo IB pero alto volumen tumoral tendrán mayor riesgo de recurrencia.
Mossbacher <i>et al.</i> (84), 1996	Volumen nuclear medio ponderado por volumen	Estimación estereológica.	32	Los melanomas gruesos (IB >4 mm) que desarrollan metástasis presentan un mayor volumen calculado mediante estereología.

Bahmer <i>et al.</i> (83), 1996	Volumen tumoral	Método de Cavalieri: determina el volumen de un campo midiendo áreas de diferentes cortes de espesor definido.	34	Este método mostró buena correlación con el IB. No estudian valor pronóstico.
Binder <i>et al.</i> (82), 1992	Volumen nuclear ponderado	Estimación estereológica.	32	Los melanomas finos (IB <0.76 mm) que no desarrollan metástasis tuvieron un volumen nuclear medio significativamente más bajo.
Friedman <i>et al.</i> (81), 1991	Volumen tumoral	Fórmula compleja que incluye diferentes secciones tomadas de placas de distintos espesores.	35	200 mm <sup>3</sup> punto de corte indicador de peor supervivencia a 5 años (91.5 % frente a 16.7 % si volumen > 200 mm <sup>3</sup> ).
Sørensen (80), 1989	Volumen nuclear tridimensional	Diferentes fórmulas matemáticas para el cálculo del volumen nuclear medio, fracción de volumen nuclear e índice nuclear.	47	Se demuestra su valor predictivo en la evaluación del pronóstico en los melanomas en estadio clínico I y II.
Gebhart y Knobler (79), 1984	Volumen tumoral	Morfometría semiautomática para el análisis volumétrico.	3	Este cálculo no mejoró la precisión pronóstica proporcionada por otros métodos más simples.

Abreviaturas. DB: densidad de Breslow; SLE: supervivencia libre de enfermedad, IB: índice de Breslow; ATC: área tumoral calculada; SG: supervivencia global; SEM: supervivencia específica de melanoma; SLM: supervivencia libre de metástasis.

#### ANEXO VII. PUBLICACIONES DERIVADAS

Figuroa-Silva O, Suárez-Peñaranda JM, Balboa-Barreiro V, Sánchez-Aguilar y Rojas MD. **Volume tumor impact on melanoma survival assessed through Breslow density.** J Am Acad Dermatol. 2021 Jun 8; S0190-9622(21)01107-5. PMID: 34116098.

Reproducción contenido de la publicación: Apartado discusión 8.6. Página 90.

Contribución doctoranda: Olalla Figuroa Silva ha contribuido y liderado tanto la concepción como el diseño del estudio, así como, la redacción del manuscrito; también ha colaborado en el análisis de los datos y en la aprobación final del artículo.

Índices de calidad: Factor de impacto<sup>TM</sup> en 2020: 11.527

Posición 1/69, Q1



Autorización de la revista para su publicación: <https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions>

## LETTER

## RESEARCH LETTER

**Volume tumor impact on melanoma survival assessed using Breslow density**

*To the Editor:* Although Breslow thickness (BT) is the most important prognostic factor in melanoma, few studies<sup>1,2</sup> have investigated the role of Breslow

density (BD), recently described as a novel morphologic prognostic biomarker that allows tumor volume estimation. BD represents the percentage of dermis occupied by invasive melanoma cells and is quickly assessed in the same area where BT is measured.<sup>1</sup>

**Table I.** Comparison of clinicopathologic features between the groups with Breslow density <65% and Breslow density ≥65%

Variable (or feature)	Breslow density < 65% (n = 61)		Breslow density ≥ 65% (n = 45)		P value
	n (%)	Mean ± SD	n (%)	Mean ± SD	
Age (years)	61 (57.5)	58.9 ± 16.1	45 (42.4)	63.7 ± 17.3	.145
Sex					.024
Men	18 (29.5)		23 (51.1)		
Women	43 (70.5)		22 (48.9)		
Tumor site					.131
Head and neck	10 (16.4)		15 (33.3)		
Trunk	23 (37.7)		14 (31.1)		
Lower extremity	16 (26.2)		6 (13.3)		
Upper extremity	12 (19.7)		10 (22.2)		
Stage					<.001
IA	53 (86.9)		7 (15.6)		
IB	7 (11.5)		9 (20)		
II	0 (0)		21 (46.7)		
III	1 (1.6)		8 (17.8)		
Histologic subtype					-
SSM	55 (90.2)		22 (48.9)		
NM	1 (1.6)		19 (42.2)		
LMM	5 (8.2)		3 (6.7)		
Other	0 (0)		1 (2.2)		
BRAF status					.067
Wild type	49 (80.3)		29 (64.4)		
Mutated	12 (19.7)		16 (35.6)		
Mitotic rate (mitoses/mm <sup>2</sup> )		0.5 ± 0.7		4.5 ± 5.5	<.001
Breslow thickness (mm)		0.7 ± 0.4		3.8 ± 4.5	<.001
Ulceration					<.001
Absent	61 (100)		30 (66.7)		
Present	0 (0)		15 (33.3)		
Months from diagnosis to death	61 (57.5)	62.1 ± 14.1	45 (42.4)	50.7 ± 20	.002
Deceased					.001
No	57 (64.8)		31 (35.2)		
Yes	4 (22.2)		14 (77.8)		
Alive/cause of death					.004
Alive/death from other causes	60 (61.9)		37 (38.1)		
Death from melanoma	1 (11.1)		8 (88.9)		
Relapse					<.001
No	60 (69)		27 (31)		
Yes	1 (5.6)		17 (94.4)		
Distant disease					.001
No	60 (63.2)		35 (36.8)		
Yes	1 (9.1)		10 (90.9)		

BRAF, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; LMM, lentigo maligna melanoma; NM, nodular melanoma; SSM, superficial spreading melanoma.

J AM ACAD DERMATOL

■ 2021 1

## ARTICLE IN PRESS

2 Letter

J AM ACAD DERMATOL  
■ 2021**Table II.** Kaplan-Meier melanoma survival probabilities

Interval (years)	Survival rate	Survival rate of group with BD <65%	Survival rate of group with BD ≥ 65%	P value
Overall survival (%)				
1	98.1	100	95.6	
5	83.7	93.4	70.3	
Mean (95% CI)	73.6 (69.6-77.7)	78.8 (75.6-81.9)	65.1 (57.2-73)	.001
Disease-free survival (%)				
1	94.3	100	86.4	
5	82.5	98.3	59.9	
Mean (95% CI)	71.2 (66.6-75.8)	81.3 (79.9-82.7)	56.3 (46.96-65.5)	<.001
Melanoma-specific survival (%)				
1	100	100	100	
5	91.7	98.3	81.7	
Mean (95% CI)	78.5 (75.6-81.4)	81.3 (80-82.7)	72.5 (66-79)	.001
Metastasis-free survival (%)				
1	94.1	100	93	
5	88.8	98.3	74.1	
Mean (95% CI)	75.4 (71.7-79.1)	81.3 (79.9-82.7)	66.4 (57.9-74.8)	<.001

BD, Breslow density.

We studied a cohort of 106 melanomas to evaluate the prognostic significance of BD and its associations with clinical and histopathologic features as well as *BRAF* mutational status. BD was calculated as previously described,<sup>1</sup> and the data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences software, version 24.0 (SPSS).

Twenty-eight (26.4%) melanomas showed V600E *BRAF* mutation, whereas 78 (73.6%) were wild type. The average BD was higher in patients with mutated *BRAF* than in patients with wild-type *BRAF* (58.6% vs 40.5%, respectively;  $P = .032$ ), and contrarily, lower (<65%) BD was associated with sex (women 70.5% vs men 29.5%;  $P = .0024$ ) and earlier stages of melanoma (IA-IB 98.4% vs II-III 1.6%;  $P < .001$ ). The features of melanomas associated with BD ≥ 65%, compared with those of melanomas associated with BD <65%, were higher BT (3.8 vs 0.7 mm, respectively;  $P < .001$ ), mitotic rate (4.5 vs 0.5 mitoses/mm<sup>2</sup>, respectively;  $P < .001$ ), and ulceration (100% vs 0%, respectively;  $P < .001$ ). Patients with BD ≥ 65% had poorer survival rates than those with BD <65% (50 vs 62 months, respectively;  $P = .002$ ). On an average, 17 months of life were lost because of melanoma, and distant disease was more common (90.9% of patients in BD >65% group vs 9.1% of patients in BD <65% group;  $P = .001$ ; Table I). Additionally, this group showed worse 5-year survival rates than the group of patients with BD <65% (overall survival rate 70.3% vs 93.4%, respectively,  $P = .001$ ; disease-free survival rate 98.3% vs 59.9%, respectively,  $P < .001$ ; melanoma-specific survival rate 98.3% vs 81.7%, respectively,

$P = .001$ ; and metastasis-free survival rate 98.3% vs 74.1%, respectively,  $P < .001$ ; Table II).

It is well known that BT, ulceration, and a high mitotic rate are correlated with a poorer melanoma outcome.<sup>3</sup> In the present study, melanomas with BD <65% had, on an average, <1 mitosis/mm<sup>2</sup> compared with >4 mitoses/mm<sup>2</sup> when the BD was ≥65%. Moreover, melanomas with BD ≥ 65% showed a mean BT of >3 mm and were commonly ulcerated. These findings can contribute to justify the presence of worse outcome for patients with BD ≥ 65%, who have a higher relapse rate and shorter interval from diagnosis to death. The correlation between BT and BD was demonstrated using Spearman Rho (0.848,  $P < .001$ ). Nevertheless, BD still had a significant impact on the overall survival rates, as demonstrated by a univariate study (hazard ratio, 1.03; 95% CI, 1.01-1.05;  $P = .001$ ). We demonstrated that *BRAF*-mutated melanomas have a greater tumoral density than those with wild-type *BRAF*, which can help to explain why *BRAF*-mutated melanomas are associated with a poorer prognosis.<sup>4</sup>

In summary, our findings emphasize the prognostic relevance of tumor volume and support the use of BD as a complementary histopathologic variable, being equated to other prognostic factors not included in staging, such as mitotic rate, regression, or lymphoid infiltration. A BD of ≥65% has proved to be a significant cutoff for worse melanoma outcomes and suggests the potential benefit of closer follow up in these patients, given their decreased survival rate.

Our study is limited by its small sample size and retrospective design; so, more studies with larger numbers of patients are needed for validation.

Olalla Figueroa-Silva, MD,<sup>a,b</sup> Jose Manuel Suárez-Peñaranda, MD, PhD,<sup>c,d</sup> Vanesa Balboa-Barreiro, MD,<sup>e</sup> and Maria Dolores Sánchez-Aguilar Rojas, MD, PhD<sup>f,g</sup>

From the Department of Dermatology, University Hospital Complex of Ferrol,<sup>a</sup> University of Santiago de Compostela,<sup>b</sup> Department of Pathology, Clinical Hospital, Santiago de Compostela,<sup>c</sup> Department of Forensic Sciences and Pathology, University of Santiago de Compostela,<sup>d</sup> Rheumatology and Public Health Research Group, Nursing research and health care, Clinical University Hospital A Coruña. SERGAS, A Coruña,<sup>e</sup> Department of Dermatology, Clinical Hospital, Santiago de Compostela,<sup>f</sup> and Department of Dermatology, University of Santiago de Compostela, Spain.<sup>g</sup>

Funding sources: None.

IRB approval status: The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital (Registration Code: 2016/129).

Correspondence and reprint requests to: Olalla Figueroa-Silva, MD, Department of Dermatology, University Hospital Complex of Ferrol, University of Santiago de Compostela, A Coruña, Spain CP15405.

E-mail: [olalla.figueroa@gmail.com](mailto:olalla.figueroa@gmail.com)

#### Conflicts of interest

None disclosed.

#### REFERENCES

1. Rashed H, Flatman K, Bamford M, Teo KW, Saldanha G. Breslow density is a novel prognostic feature in cutaneous malignant melanoma. *Histopathology*. 2017;70(2):264-272.
2. Saldanha G, Yarrow J, Pancholi J, et al. Breslow density is a novel prognostic feature that adds value to melanoma staging. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(6):715-725.
3. Eriksson H, Frohm-Nilsson M, Järäs J, et al. Prognostic factors in localized invasive primary cutaneous malignant melanoma: results of a large population-based study. *Br J Dermatol*. 2015; 172(1):175-186.
4. Nagore E, Requena C, Traves V, et al. Prognostic value of BRAF mutations in localized cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(5):858-862.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.06.007>





El melanoma es el principal responsable de la mayoría de muertes por cáncer cutáneo. Estratificar correctamente a los pacientes según el riesgo de desarrollo de metástasis y su probabilidad de mortalidad es de vital importancia, de ahí que la identificación de nuevos factores pronóstico sea motivo de estudio constante. Se propone la estandarización del análisis de la Densidad de Breslow, parámetro que permite estimar el volumen tumoral. Dado su carácter bidimensional es probable que refleje mejor la carga tumoral y pueda colaborar en la predicción del comportamiento de un melanoma.