

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

Caracterización histológica de los melanomas con mutaciones  
en el promotor de TERT

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Virginia Sanz Motilva

DIRECTORES

Eduardo Nagore Enguídanos  
Onofre Sanmartín Jiménez  
José Luis Rodríguez Peralto

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

Caracterización histológica de los melanomas con mutaciones en el promotor de TERT

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Virginia Sanz Motilva

DIRECTORES

Eduardo Nagore Enguádanos

Onofre Sanmartín Jiménez

Jose Luis Rodríguez Peralto





# *Agradecimientos*

## AGRADECIMIENTOS

A mis 3 directores de tesis por todo el esfuerzo, cariño y paciencia que han puesto en esta tesis. Todos ellos han sido claves en alguna etapa de estos últimos años.

A Edu, por el apoyo constante en todas etapas de la tesis, por estar siempre disponible para contestarme todas las dudas aún desde la otra punta del mundo, por sus palabras de ánimo y consejos de la vida. Sin él esta tesis no hubiese sido posible.

A Onofre por su cariño, por su confianza y por su amistad. Por ayudarme a abrir los ojos de nuevo a la dermatología en una etapa de mi vida difícil y por ayudarme a desconectar y a concentrarme en el trabajo olvidando por un rato los problemas familiares.

A José Luis, mi paisano andaluz, bellísima persona, respetado y divertido, y a mis ojos como mi otro jefe del 12, aparte de Paco, que nos enseñó desde el principio la imprescindible disciplina de la dermatopatología, haciendo que pareciera fácil cuando realmente era tremendamente difícil. Siempre tuve claro que en mi tesis doctoral siempre contaría con él.

Al hospital 12 de Octubre, mi “casa”, a donde siempre me gusta volver y del que tanto soporte hemos recibido mi familia y yo, y en especial al servicio de dermatología, a Paco Vanaclocha, mis coeres Jimena y María, mis resis mayores y pequeños, los adjuntos, enfermeras, auxiliares y administrativas pues todos ellos fueron testigos de mis comienzos en el mundo de la dermatología.

A todo el servicio de dermatología del IVO y a la AECC que me cuidó y me apoyó en la etapa hasta ahora más difícil de mi vida. A Liria, a Celia y a Esperanza que me han ayudado en las interpretaciones frente al microscopio de forma desinteresada.

Al mis compañeros del Hospital de Manises que ahora son mis amigos.

A mis grandes amigas Silvirriqui, Rocío, Irene y María Jesús pertenecientes a distintas etapas de mi vida, pero que aunque pásenlos años, la confianza y complicidad sigue siendo la del primer día. A mis amigas de Sevilla, de Sancti Petri y Valencia por apoyarme en mis ausencias causadas por esta tesis.

A mi familia política, que me ha hecho sentir en casa desde el comienzo de mi andadura en Valencia, por ser una familia unida, ejemplar y acogedora además de grandes trabajadores.

A mi padre, ejemplo de lucha por la vida, que cuando estábamos construyendo los cimientos de esta tesis, la vida le puso a prueba, gracias a su fortaleza, esfuerzo, y con nuestro cariño y apoyo, salió adelante.

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre, ejemplo a seguir, con su esfuerzo incansable en toda su carrera profesional, hasta llegar a ser catedrática, siempre la recordará trabajando y estudiando. Por demostrar que con la perseverancia y el tesón se consiguen cosas inicialmente impensables.

A mi hermana, mi mejor amiga, mi confidente, indispensable en mi vida.

A mi pequeña Virginita, otra luchadora que no lo tuvo nada fácil cuando estaba en mi tripilla pero que salió adelante, puro estilo de su abuelo Andrés.

A Antonio, mi compañero de vida, mi alegría, mi inspiración, mi amor.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

Capítulo 1. Siglas.

Capítulo 2. Abstract.

Capítulo 3. Resumen.

Capítulo 4. Introducción.

1 Datos de incidencia y mortalidad a nivel general.	28
1.2 Distribución por sexo.	31
1.3 Situación en España.	31
2. Factores pronósticos de melanoma.	32
2.1 Factores integrados en la estadificación actual del MM.	32
2.1.1 Tumor primario (T).	33
2.1.2 Afectación regional nodal (N).	34
2.1.3 Metástasis a distancia (M).	35
2.2 Estadios del melanoma.	36
2.3. Factores clínicos.	37
2.4 Factores moleculares y séricos.	37
2.5 Factores y características histopatológicas del melanoma.	38
2.5.1. Fases de crecimiento del melanoma.	40
2.5.1.1 Fase de crecimiento radial.	41
2.5.1.1.1 Melanoma in situ.	41
2.5.1.1.2 Melanoma in situ microinvasivo.	41
2.5.1.2 Fase de crecimiento vertical.	41
2.5.2 Subtipos histológicos clásicos de melanoma.	42
2.5.3 Variantes histológicas menos comunes.	42
2.5.3.1 Melanoma nevoide.	42
2.5.3.2 Melanoma desmoplásico.	43
2.5.3.3 Melanoma dérmico solitario.	43
3. Genética y biología molecular del melanoma.	43
3.1. Biología del melanocito.	43
3.2 La evolución genética del melanoma desde las lesiones precursoras.	44
3.3. Vía MAPK.	45
3.3.1 Prevalencia de las mutaciones BRAF y NRAS.	46
3.3.2 Implicación pronóstica de las mutaciones en BRAF y NRAS.	47
3.3.3 Caracterización histológica de los MM con mutación en BRAF y NRAS.	47
3.4 Importancia de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT).	48
3.4.1 Prevalencia y pronóstico de la mutación en pTERT.	50

Capítulo 5. Hipótesis. 52

Capítulo 6. Objetivos.	56
1. Objetivo principal.	59
2 Objetivos secundarios.	59
Capítulo 7. Material y métodos.	
Capítulo 8. Resultados.	
Capítulo 9. Discusión.	
Capítulo 10. Conclusiones.	
Capítulo 11. Bibliografía.	
Capítulo 12. Anexos.	

## CAPÍTULO I

### ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 4. Introducción. ....	26
Figura 1 .....	28
Figura 2 .....	29
Figura 3 .....	29
Figura 4 .....	31
Figura 5 .....	32
Figura 6 .....	32
Figura 7 .....	44
Figura 8 .....	46

Capítulo 5. Hipótesis.

Capítulo 6. Objetivos.

Capítulo 7. Material y métodos.

Capítulo 8. Resultados.

Capítulo 9. Discusión.

Capítulo 10. Conclusiones.

Capítulo 11. Bibliografía.

Capítulo 12. Anexos.



## CAPÍTULO I

### ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 4. Introducción. ....	26
Tabla 1 .....	33
Tabla 2 .....	35
Tabla 3 .....	36
Tabla 4 .....	36
Tabla 5 .....	38
Tabla 6 .....	42

Capítulo 5. Hipótesis.

Capítulo 6. Objetivos.

Capítulo 7. Material y métodos.

Capítulo 8. Resultados.

Capítulo 9. Discusión.

Capítulo 10. Conclusiones.

Capítulo 11. Bibliografía.

Capítulo 12. Anexos.



## CAPÍTULO 1

# *01. Siglas*

---

## CAPÍTULO 1

AJCC	“American Joint Committee on Cancer “
ALT	“Alternative lengthening of telomeres”
CDKNA	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
EN	Eduardo Nagore
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ETS	Factor de transcripción E26
HR	Hazard Ratio (cociente de riesgo o riesgo relativo)
IVO	Instituto Valenciano de Oncología
JLRP	José Luis Rodríguez Peralto
LDH	Lactato deshidrogenasa
LM	Lentigo maligno
LMM	Lentigo maligno melanoma
MAPK	Vía de la proteína quinasa activada por mitógenos
MC1R	Receptor de la melanocortina 1
MEK	MAPK/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) quinasa
MITF	Factor de transcripción asociado a microftalmia
mm	Milímetros
MES	Melanoma de extensión superficial
MMis	Melanoma maligno in situ
MLA	Melanoma maligno lentiginoso acral
MN	Melanoma maligno nodular

## SIGLAS

MSH	Hormona estimulante de alfa-melanocitos o melanotropina
NCI	National Cancer Institute
OS	Onofre Sanmartín
PCA/ACP	“Principal component analysis” (Análisis de componentes principales)
PLS	“Partial Least Squares” (Mínimos cuadrados parciales)
PLSDA	“Partial Least Squares Discriminant Analysis” (Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales)
POMC	Proopiomelanocortina
pTERT	Promotor del gen de la transcriptasa inversa de telomerasa
SCR	Suma de cuadrados residual
SEEER	“Surveillance, Epidemiology, and End Results (program)”
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
TCGA	“Cancer Genome Atlas”
TERT	Transcriptasa inversa de la telomerasa
TNM	“Tumor, regional lymph Nodes, distant Metastatic sites “
UICC	“Union for International Cancer Control “
VSM	Virginia Sanz Motilva
WT	“Wild type”

## CAPÍTULO 2

## *02. Abstract*

---

## CAPÍTULO 2

Along with mutations in the BRAF and NRAS genes, those in the promoter of the TERT gene (pTERT) are the most frequent somatic mutations in malignant melanoma (MM). (1)

The latter have recently shown an important relevance since they condition a greater aggressiveness of the MM, which translates into worse survival, especially if they are associated with mutations in BRAF or NRAS. (2–5)

Additionally, certain histological findings characteristic of MM, such as ulceration, the mitotic index or a higher Breslow index, allow a worse prognosis to be predicted.

Furthermore, it has been described that fast-growing MM, with a more aggressive behavior, show almost twice as many mutations in pTERT than slow-growing ones.(6)

There are histopathological findings in relation to specific mutations, such as in the case of BRAF. Thus, MM with BRAF mutations have a predominance of epithelioid cellularity with nest formation, intense pigmentation, and pagetoid extension. However, in the case of NRAS, such characteristic data have not been found. (7) Finally, it is unknown whether MM with a pTERT mutation present characteristic histological features like those with a BRAF mutation.

Given the prevalence of mutations in pTERT and the possible prognostic value that it confers, our main objective was to characterize the population of patients with MM mutated in pTERT histologically. Thus, the present work intends to investigate whether MM with a mutation in pTERT present characteristic histological features and, in addition, if we detect them, to assess the influence of the presence or absence of a concomitant BRAF mutation.

We defined and classified a set of histopathological variables through a previous study of interobserver variability that included the first 60 consecutive cases of the study population.

Once the study variables were established, all the cases of the study population (346 cases) were studied histologically. Finally, they were classified according to whether they had the mutation in pTERT and in BRAF. Univariate logistic regression models and a multivariate study consisting of a discriminant analysis of partial data were performed, in which it was observed that the presence of mutations in pTERT was related to intense elastosis, a high mitotic index and histological types other than acral lentiginous. These mutations differed according to the presence of BRAF mutations. BRAF-/pTERT+ MMs had no pigmentation, an expansive growth pattern, and the presence of intense elastosis, while BRAF+/pTERT+ MMs were characteristically nodular, with a polypoid morphology, ulcerated, and elevated mitotic and Breslow levels.

Even though the error rate of the predictive capacity of the models was high, we have been able to observe that the presence of mutations in pTERT and their combination with mutations in BRAF is associated with some morphological characteristics, among which the association with an intense degree of solar elastosis and a nodular and polypoid appearance with typical characteristics of poor prognosis (presence of ulceration and a high tumor thickness and number of mitoses).

## CAPÍTULO 3

## *03. Resumen*

---

## CAPÍTULO 3

## RESUMEN

Junto con las mutaciones en los genes BRAF y NRAS, las mutaciones en el promotor de TERT (pTERT) son las mutaciones somáticas más frecuentes en el melanoma maligno (MM). (1)

Estas últimas han mostrado recientemente una relevancia importante ya que condicionan una mayor agresividad del MM, lo que se traduce en una peor supervivencia, sobre todo si se asocian a mutaciones en BRAF o NRAS. (2–5)

Adicionalmente, ciertos hallazgos histológicos característicos del MM como son la ulceración, el índice mitótico o un mayor índice de Breslow, permiten predecir un peor pronóstico.

Además, se ha descrito que los MM de rápido crecimiento, con un comportamiento más agresivo, muestran casi el doble de mutaciones en el pTERT que los de lento crecimiento. (6)

Existen ciertos hallazgos histopatológicos en relación con mutaciones concretas como es en el caso de BRAF. Así, los MM con mutaciones en BRAF tienen un predominio de celularidad epitelioides con formación de nidos, pigmentación intensa y extensión pagetoide. Sin embargo, en el caso de NRAS, no se han hallado datos tan característicos. (7) Por último, se desconoce si los MM con mutación en el pTERT presentan de una forma similar a aquellos con mutación en BRAF rasgos histológicos característicos.

Dada la prevalencia de mutaciones en el pTERT y el posible valor pronóstico que confiere, nos planteamos como objetivo principal caracterizar histológicamente a la población de pacientes con MM mutados en pTERT. Así, el presente trabajo pretende investigar si los MM con mutación en pTERT presentan rasgos histológicos característicos y, además, en caso de que los detectemos, valorar la influencia de la presencia o ausencia de mutación de BRAF concomitante.

Definimos y clasificamos un conjunto de variables histopatológicas mediante un estudio previo de variabilidad interobservador que incluyó los primeros 60 casos consecutivos de la población de estudio. Una vez establecidas las variables del estudio, se estudiaron histológicamente todos los casos de la población de estudio (346 casos). Por último, se clasificaron según presentaban la mutación en pTERT y en BRAF. Se realizaron modelos de regresión logística univariada y un estudio multivariado consistente en un análisis discriminante de datos parciales en el que se observó que la presencia de mutaciones en pTERT se relacionó con una elastosis intensa, un índice mitótico alto y tipos histológicos diferentes al lentiginoso acral. Estas mutaciones diferían según la presencia de mutaciones en BRAF. Los MM BRAF-/pTERT+ tenían ausencia de pigmentación, un patrón de crecimiento expansivo y la presencia de elastosis intensa, mientras que los MM BRAF+/pTERT+ eran característicamente nodulares, con una morfología polipoide, ulcerados y con un índice mitótico y un índice de Breslow elevados.

A pesar de que la tasa de error de la capacidad predictiva de los modelos era elevada, hemos podido observar que la presencia de mutaciones en pTERT y su combinación con mutaciones en BRAF se asocia a algunas características morfológicas, entre las que destacan la asociación a un grado intenso de elastosis solar y a la apariencia nodular y polipoide con características típicas de mal pronóstico (presencia de ulceración y un espesor tumoral y número de mitosis elevados).

## CAPÍTULO 4

# *04. Introducción*

---

Situación actual y epidemiología

1 Datos de incidencia y mortalidad a nivel general.

En los últimos años se ha producido un aumento de la incidencia global de melanoma (MM). En un estudio reciente se mostró un aumento de la incidencia de un 161,3% entre los años 1990 y 2017. (8)

Para comprender mejor la prevalencia global del cáncer, el proyecto Globocan representa una iniciativa de la “International Agency for Research on Cancer” (IARC) que tiene como objetivo proporcionar las estimaciones actuales de incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer, entre los que figura el MM cutáneo. (9) Así, según esta base de datos “on-line”, en 2020 se registraron 324.635 nuevos casos de MM y un total de 57.043 muertes a nivel mundial. Respecto a tasas de incidencia global, Europa representó la región número 1 en número de casos incidentes, prevalentes y de mortalidad. (9,10)

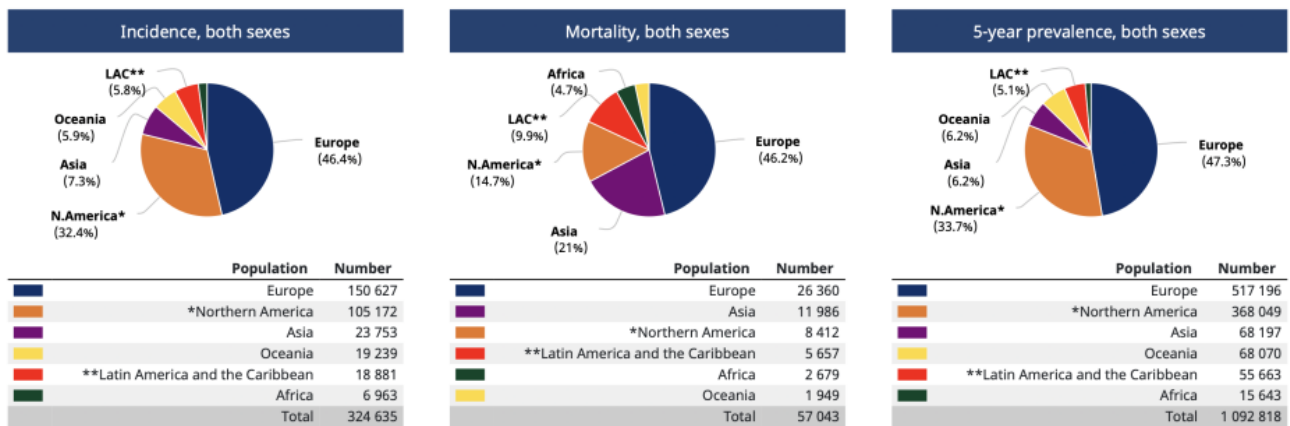


Figura 1 Incidencia, mortalidad (2020) y prevalencia a 5 años a nivel mundial y por regiones. Fuente: Globocan 2020. (10)

Al realizar el ajuste por edad, el orden de las tasas sufre algunas variaciones. De esta manera las 5 regiones a nivel mundial con las tasas de incidencia estandarizadas por edad más altas fueron en orden decreciente: Oceanía, Oeste de Europa, Norte de Europa, Norte América, Sur de Europa, Centro y Este de Europa.

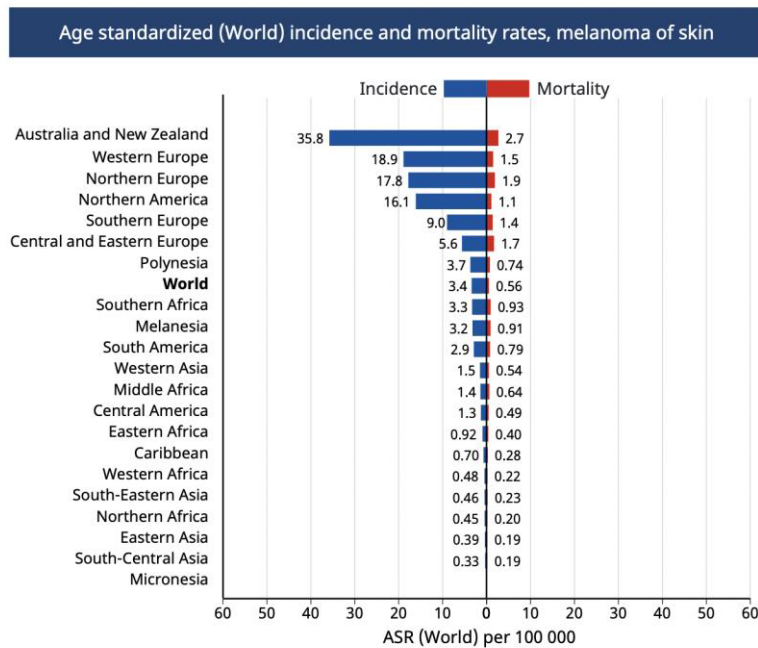


Figura 2 Tasas de incidencia y mortalidad ajustadas por edad y según regiones a nivel mundial. Fuente Globocan 2020. (10)

Según la incidencia ajustada por edad (figura 3), los valores más elevados se detectan en Australia y Nueva Zelanda, seguidos de forma decreciente por diferentes países del continente europeo (Dinamarca, Países Bajos, Noruega, Suecia, Suiza y Alemania).

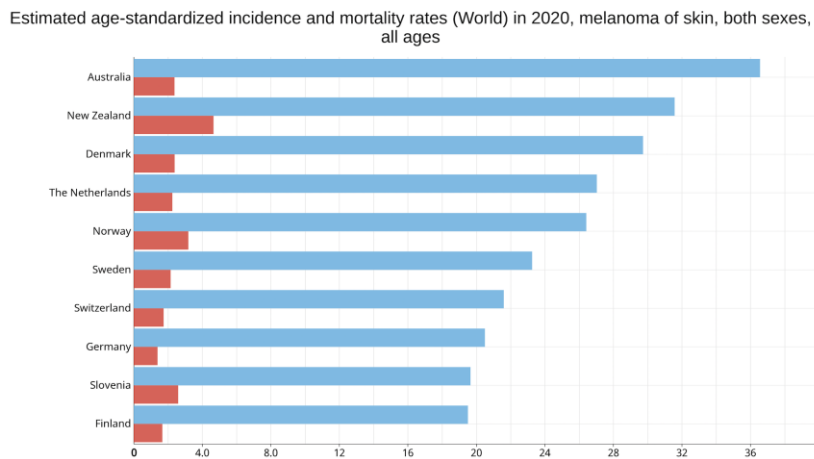


Figura 3 Tasas estimadas de incidencia y mortalidad ajustadas por edad y según países. Fuente Globocan 2020. (10)

Australia y Nueva Zelanda se sitúan en primera posición en cuanto a datos de incidencia a lo largo de los años. Las razones están bien documentadas y se han relacionado con la implicación que tiene la exposición a la radiación ultravioleta (UV) en la etiopatogenia del MM cutáneo. En esta región geográfica, los niveles de radiación UV son muy altos durante todo el año y la población mayoritaria presenta fototipos bajos. A ello se le une un comportamiento cultural y social que favorece la exposición solar y el bronceado. (11)

Algunos investigadores han sugerido que el aumento de la incidencia de MM puede ser debido a un incremento del número de biopsias y a la tendencia a emitir el diagnóstico histológico de MM en lesiones melanocíticas atípicas, sobre todo en sus fases iniciales. Pero este razonamiento no explica algunas cuestiones como el aumento de las tasas de mortalidad, especialmente en hombres mayores. (12)

Otros investigadores defienden que el aumento de incidencia de MM podría estar relacionado con un incremento de las campañas de detección precoz, lo que justificaría una mayor precocidad en el diagnóstico de lesiones más finas e indolentes. (13)

A partir de los datos incluidos en el programa llamado “The Surveillance, Epidemiology, and End Results” (SEER), promovido por el organismo “National Cancer Institute” (NCI) de los EE. UU. se llevó a cabo un estudio del periodo comprendido entre 1992 y 2004 en la población blanca no hispánica y se encontró un aumento de la incidencia de MM de todos los grosores, independientemente del nivel socioeconómico. (14) De todos los participantes, las personas con un menor nivel socioeconómico y con un menor acceso a campañas de detección precoz, mostraron el aumento más pronunciado de incidencia de MM gruesos. Sin embargo, también se objetivó un aumento de incidencia de MM de todos los grosores en el grupo de pacientes con mayor estatus socioeconómico. (14)

En el programa de cribado SCREEN (“Skin Cancer Research to Provide Evidence for Effectiveness of Screening in Northern Germany”) llevado a cabo en el norte de Alemania (región de Schleswig-Holstein), de 1 año de duración, se observó que la incidencia de MM de todos los grosores aumentó durante ese mismo año, pero volvió a los niveles basales a los tres años siguientes a la finalización del programa de detección precoz. Por el contrario, en la población de control la incidencia creció ligeramente durante todo el periodo del estudio. (15) Estos resultados sugieren que las campañas de detección precoz son responsables en parte, pero no completamente, del aumento de incidencia de MM.

Tras cinco años del fin del programa SCREEN en Schleswig-Holstein, se objetivó que las tasas de mortalidad tanto en hombres y mujeres fueron más de un 50% inferiores respecto a las tasas esperadas. Los autores defienden como limitación de su estudio que no pudieron llevar a cabo un ensayo clínico aleatorizado. (16)

En lo que respecta a la mortalidad y a su variación a lo largo de los años, existen datos dispares según los grupos de edad y la zona geográfica. Así en Australia en el periodo de años de 1950 a 2002, la mortalidad por MM disminuyó entre un 2 y 3 % en el grupo de edad de los 35 a los 54

años, sin embargo, las tasas permanecieron estables en el grupo de los 55 a los 79 años. (17)

En el periodo entre 2002 y 2006 en Estados Unidos se observó un descenso de la mortalidad en individuos menores a 65 años. Sin embargo, hubo un aumento de la mortalidad en los mayores de 65 años (+6,6% en hombres y +0,6% en mujeres). En cualquier caso, el descenso de la mortalidad en las personas más jóvenes podría estar en relación con el éxito de las campañas de educación pública y de detección precoz. (18,19)

### 1.2 Distribución por sexo

En lo que respecta al género, analizando los 10 países con mayor incidencia de MM y tras ajustar las tasas por edad, se observa una cierta dispersión de los datos, con unas tasas en general superiores en los hombres, similar en ambos sexos en los Países Bajos, o tasas mayores en las mujeres de Dinamarca, Noruega y Suecia (Fig. 4). No ocurre así con las tasas de mortalidad, que fueron superiores en los hombres en todos los países.

Por último, en la población mayor de 50 años las tasas de incidencia y de mortalidad global fueron superiores en los hombres. (9)

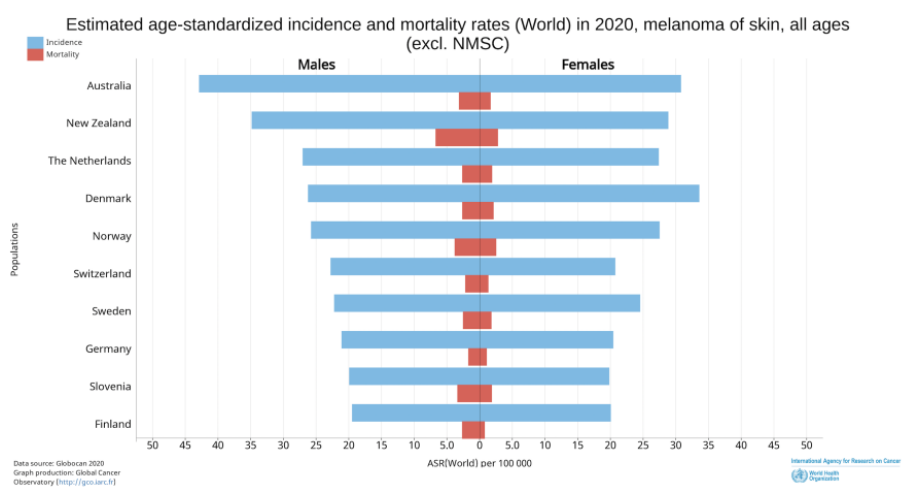


Figura 4 Tasas de incidencia y mortalidad estimadas y ajustadas por edad según sexo en los 10 países con mayor prevalencia a nivel mundial. Fuente: Globocan 2020. (10)

### 1.3 Situación en España

Un estudio tipo metaanálisis publicado en 2015, mostró una tasa de incidencia bruta de 8,82/100.000 personas-año y una tasa de mortalidad bruta de 1,82 por 100.000 personas-año en España. (20) Al igual que lo que sucede en el resto de los países, existe una tendencia al alza de la incidencia con el paso de los años. La tasa de incidencia bruta estimada en el año 2020 se ha incrementado a valores de 12,3/100.000 personas-año y la de mortalidad bruta a 2,3 por 100.000 personas-año. (Fig. 5 y 6) (9)

Es previsible que las tasas continúen aumentando en el futuro, especialmente en la población anciana. El motivo podría estar relacionado con una población más envejecida en la que hay una mayor prevalencia de MM gruesos. (14)

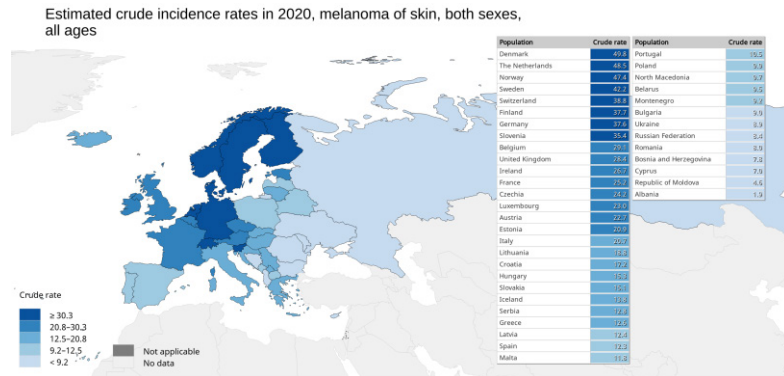


Figura 5 Tasas estimadas brutas de incidencia en Europa en el año 2020. Fuente: Globocan 2020. (10)

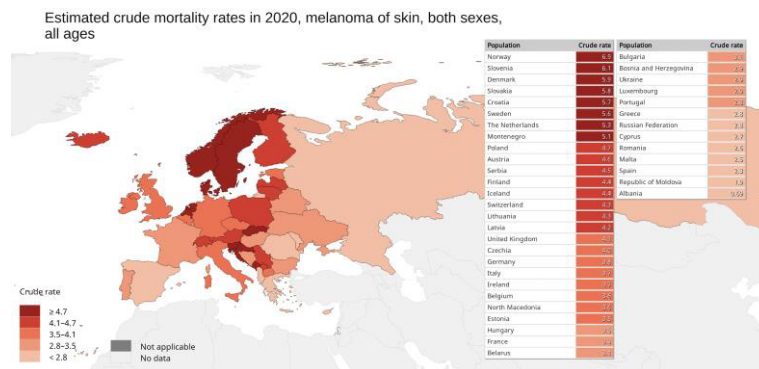


Figura 6 Tasas estimadas brutas de incidencia en Europa en el año 2020. Fuente: Globocan 2020.

## 2. Factores pronósticos de melanoma

### 2.1 Factores integrados en la estadificación actual del MM

El sistema actual de estadificación fue creado por la “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) en colaboración con la “Union for International Cancer Control” (UICC).

Este sistema se basa en las siglas, TNM: T: tumor de “primary tumor”, N: ganglios linfáticos regionales de “regional lymph Nodes”, M: metástasis a distancia de “distant Metastatic sites”.

La actual edición de la AJCC es la octava y está sustentada por los datos de supervivencia evaluados en más de 46.000 pacientes, de 10 centros de todo el mundo con MM de estadios del I al III desde 1998. (21,22)

En esta edición se ha prestado una atención especial a mejorar algunos aspectos importantes en cuanto a la clasificación y a la terminología para así obtener mejores modelos pronósticos que permitan optimizar la toma de decisiones con los pacientes de MM.

Dado el gran avance de los últimos años en cuanto al tratamiento del MM en estadio IV que ha supuesto una mejoría en las tasas de supervivencia de estos pacientes, no se ha realizado en esta edición el análisis de los pacientes en estadio IV. Sin embargo, sí que se han incluido algunos cambios en la categoría IV que permitirán más adelante mejorar la estimación pronóstica y la estratificación de estos pacientes con enfermedad avanzada. (22)

### 2.1.1 Tumor primario (T)

La actual edición de la AJCC usa los mismos parámetros que se usaron en la séptima edición con la excepción del índice mitótico, que se ha eliminado como criterio de subclasificación para los tumores T1. Sin embargo, en el documento subraya que es un factor pronóstico importante que ha de tenerse en cuenta para el MM en cualquier estadio.

El espesor tumoral medido en milímetros (índice de Breslow) es una variable continua que está asociada con el riesgo de recaída y de fallecimiento, y está integrado en la estadificación con intervalos.

El valor que se debe anotar es el más cercano a 0,1 mm, con un solo decimal, a diferencia de los 2 decimales que se tenían en cuenta anteriormente. (22)

En la tabla 1 se sintetiza la información respecto a T. (Tabla 1).

Tabla 1. Estadiaje del mm respecto a T (del inglés tumor/tumor)

T0	MM primario desconocido o completamente regresado
Tis	MM in situ (MMis)
TX	MM cuyo espesor no puede ser calculado (por ejemplo, si el diagnóstico se ha hecho a partir de una muestra obtenida por curetaje)
T1	MM ≤1 mm; T1a <0,8 mm sin ulceración/T1b <0,8 mm con ulceración o 0,8-1,0 mm con/sin ulceración
T2	MM > 1,0 a 2,0 mm; T2a sin ulceración/T2b con ulceración
T3	MM 2,0 a 4,0 mm; T3a sin ulceración/T3b con ulceración
T4	MM > 4,0m; T4a sin ulceración/T4b con ulceración o ulceración desconocida
T: Características de la tumoración primaria	

La subdivisión de los tumores T1 por su grosor en la octava edición de la AJCC se basa en el análisis de 7.568 pacientes con T1N0. (22) En el análisis multivariante, la supervivencia específica fue peor para los MM  $\geq 0,8$  en comparación con los  $< 0,8$  mm (riesgo relativo o HR “hazard ratio” 1,7). La supervivencia específica del MM fue también peor para aquellos con ulceración que para aquellos que no la tenían (HR 0.57). La distinción que utilizó el límite de 0,8 mm también fue predictiva para la positividad de la biopsia del ganglio centinela, pues menos del 5% de los MM  $< 0.8$  mm presentaron metástasis en el ganglio centinela, mientras que entre el 5 y el 12% en aquellos con espesor de 0,8-1,0 mm la presentaron.

El índice mitótico (tomado como una variable dicotómica comparando  $< 1$  mitosis/mm<sup>2</sup> con  $\geq 1$  mitosis/mm<sup>2</sup>), no fue un factor independiente en el análisis multivariante en los pacientes con MM T1.

Por esta razón, y a diferencia de la séptima edición en la que sí lo estaba, el índice mitótico no se contempla en la octava edición para el tumor primario T1. Sin embargo, en el análisis univariante de la actual estadificación se observó que en los MM sin afectación clínica nodal (cN0) la supervivencia específica disminuía progresivamente con el aumento del índice mitótico. (22)

Por tanto, a pesar de que quede fuera del sistema de estadificación, el índice mitótico tiene un importante valor pronóstico dentro de todas las categorías de espesor y debe recogerse siempre en el informe histológico.

### 2.1.2 Afectación regional nodal (N)

Los ganglios linfáticos regionales constituyen una localización común para las metástasis de MM y su afectación tiene un gran impacto negativo en el pronóstico a largo plazo. A pesar del término, en este apartado se hace referencia a la extensión metastásica de la enfermedad a través de los conductos linfáticos y, por lo tanto, se incluye tanto la afectación ganglionar regional como la cutánea locorregional (satelitis micro/macroscópicas, metástasis en tránsito).

Para facilitar la estadificación, se ha establecido que todos los pacientes con una confirmación histológica de diseminación linfática (incluyendo metástasis ganglionares regionales, microsatélites, satélites y metástasis cutáneas o subcutáneas en tránsito) y sin metástasis a distancia, sean clasificadas como estadio III, independientemente de la carga de enfermedad ganglionar. En la actual edición la afectación ganglionar se clasifica como clínicamente oculta (detectada mediante el estudio histológico del ganglio centinela) o clínicamente detectada (a través de la exploración física o de una prueba de imagen). Esto constituye una diferencia terminológica respecto a la anterior edición, pues la afectación ganglionar se clasificaba como microscópica y macroscópica.

Se acepta el diagnóstico de las metástasis ganglionares basado únicamente en la confirmación por tinción inmunohistoquímica, incluso si solo hay agregados de unas pocas células. (21)

No se hace distinción entre lesiones satélite, tanto microscópicas como macroscópicas, y metástasis en tránsito porque ambas representan una manifestación de enfermedad intralinfática. (Tabla 2).

Tabla 2. Estadaje del MM respecto a N (del inglés “node”/ganglio linfático)

NX	Los ganglios no se pueden determinar (ejemplo: no se ha hecho el examen del ganglio centinela, han sido previamente resecados).
N1	Un ganglio linfático afectado o metástasis en tránsito, satélite o microsátélites sin afectación ganglionar; N1a: ganglio detectado por estudio del ganglio centinela/N1b: ganglio detectado por exploración clínica/N1c: no ganglio, sí metástasis en tránsito, satélites o microsátélites.
N2	Dos o tres ganglios afectados, o metástasis en tránsito, satélite o microsátélites con un solo ganglio afecto; N2a: ganglios clínicamente ocultos detectados por estudio del ganglio centinela/N2b: ganglios detectados por exploración clínica/N2c: un ganglio afecto y además metástasis en tránsito, satélites o microsátélites.
N3	Cuatro o más ganglios afectos o metástasis en tránsito, satélites o microsátélites con dos o más ganglios afectos o cualquier número de ganglios apelotonados con o sin metástasis en tránsito, satélite o microsátélites; N3a: cuatro o más ganglios clínicamente ocultos/N3b: cuatro o más ganglios, al menos un ganglio de detectado clínicamente o bien presencia de ganglios en conglomerado/N3c: dos o más ganglios clínicamente ocultos o detectados y/o presencia de ganglios en conglomerado, además de la presencia de metástasis en tránsito, satélites o microsátélites.
N: afectación ganglionar	

### 2.1.3 Metástasis a distancia (M)

En la estadificación los pacientes son subcategorizados según el lugar de afectación de las metástasis.

Los cambios fundamentales con respecto a la séptima edición incluyen la integración de la valoración de presencia del marcador lactato deshidrogenasa (LDH) para cada una de las categorías y la creación de una cuarta categoría (M1d) basada en la presencia de metástasis del sistema nervioso central. (22). (Tabla 3).

Tabla 3. Estadaje del MM respecto a M (del inglés metastasis/metástasis)

M1a	Metástasis cutáneas a distancia, subcutáneas o linfáticas
M1b	Metástasis pulmonares
M1c	Metástasis en otras localizaciones, excepto el sistema nervioso central
M1d	Metástasis en el sistema nervioso central, con o sin afectación de otras localizaciones
M: Afectación metastásica a distancia	

La LDH es un factor pronóstico independiente en paciente con MM metastásico, y una elevación de LDH no condiciona en esta edición un traslado a la categoría M1c. En la actual edición, cada una de las categorías M1 se subdivide en (0) para LDH en niveles normales y (1) para LDH elevada.

## 2.2 Estadios del melanoma

Tras haber revisado el significado de las siglas de la clasificación TNM, se agrupan los tumores en estadios según sus características (tabla 4.)

Tabla 4. Estadios del MM según la octava edición de la AJCC

Estadio I	Pacientes con MM de bajo riesgo (T1a, T1b y T2a) sin evidencia de metástasis regionales o a distancia. Se clasifica en IA y IB en función del espesor del tumor primario y la presencia o ausencia de ulceración.
Estadio II	Incluye aquellos tumores primarios con más alto riesgo de recurrencia (T2b, T3a, T3b, T4a y T4b) sin evidencia de metástasis linfáticas ni a distancia. Se clasifica en IIA, IIB, IIC en función del espesor tumoral y la presencia o ausencia de ulceración.
Estadio III	Incluye aquellos MM con evidencia histológica de afectación de ganglios linfáticos regionales o la presencia de metástasis en tránsito o satélites (N1, N2 y N3). Se subclasifican en IIIA, IIIB, IIIC, o IIID dependiendo de la extensión de la afectación linfática.  También incluye aquellos pacientes cuyo tumor primario es desconocido (T0) y debutan con metástasis aisladas en los ganglios linfáticos, en la piel o tejido celular subcutáneo, asumiendo que no existen otras áreas afectadas.
Estadio IV	Último estadio definido por la presencia de metástasis a distancia. Las metástasis del sistema nervioso central (M1d) están especialmente asociadas con un mal pronóstico. No hay subgrupos.  También incluye la presencia de un tumor primario desconocido con metástasis a distancia.

### 2.3. Factores clínicos

Respecto al género, las mujeres con MM presentan una mejor supervivencia respecto a los hombres, probablemente en relación con las diferencias en la biología tumoral o a la interacción tumor-huésped.(23)

La ventaja en supervivencia en las mujeres se ha descrito en todos los estadios tumorales, en los que el sexo femenino presenta una mejor supervivencia específica (HR 0,62-0,74) y un menor riesgo de desarrollar metástasis nodales (HR 0,58-0,70) que los varones. (24) Algunos autores consideran el sexo un factor pronóstico independiente mientras que otros encontraron que la ventaja de la supervivencia de las mujeres desaparecía tras ajustar para otras variables como la ulceración, la tasa mitótica, la localización anatómica y el espesor de Breslow. (25)

La localización anatómica del tumor primario se ha reconocido como un factor pronóstico independiente para la supervivencia, siendo los MM situados en cabeza y cuello los que presentan peor supervivencia libre de enfermedad (SLE)(26) y peor supervivencia global (SG). Un estudio que incluía un análisis multivariado objetivó que la localización del MM en la cabeza y el cuello en comparación con otras localizaciones anatómicas, a pesar de asociarse a una menor tasa de positividad del ganglio centinela, fue un factor independiente y predictivo para una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. (27)

Igualmente la localización acral implica un peor pronóstico en términos de supervivencia, (28)(29) especialmente los MM de localización ungueal. (30) En otro estudio se observó que la localización acral es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de metástasis ganglionares en MM en estadios I y II. (31)

La edad avanzada se asocia generalmente a una disminución de la supervivencia específica. En un estudio reciente de 7.756 pacientes en estadio I/II y usando la cohorte de la base de datos de la AJCC, una edad mayor a 70 años se asoció con peores características del tumor primario y con un aumento de la mortalidad comparado con Los pacientes más jóvenes. Por contra, la incidencia de la positividad del ganglio centinela fue menor en el grupo de edad avanzada. (32) En un estudio relacionado, la edad junto con el número de metástasis ganglionares, la presencia de ulceración y la tasa mitótica estaban independientemente asociadas con un peor pronóstico en pacientes en estadio III. (33)

### 2.4 Factores moleculares y séricos

A fin de mejorar la valoración pronóstica de los pacientes con MM, se han estudiado varios biomarcadores moleculares.

En algunos trabajos han hallado diversas mutaciones en algunos genes con una posible importancia pronóstica entre los que destacan: ERBB3, AKT, MITF, PTEN, BCL2 y NCOA3. Sin embargo, el valor relativo pronóstico tras ajustar por otras variables clínico-patológicas, particularmente por la

afectación ganglionar y por el espesor de Breslow no está bien establecido todavía y se necesitan estudios adicionales que confirmen su valor pronóstico independiente (34)

El marcador sérico que ha sido ampliamente aceptado por su valor pronóstico es la enzima LDH en los melanomas metastásicos. La elevación de LDH en un paciente con MM se asocia a una peor supervivencia. Así un estudio que incluía 71 pacientes con MM avanzado (estadio IV), demostró que la LDH fue el único marcador tumoral que se relacionó de forma independiente con un peor pronóstico. Estos hallazgos llevaron a que se incorporara en la estadificación de la AJCC para los pacientes con enfermedad metastásica. (35,36) En los últimos años, han surgido las células circulantes tumorales como un nuevo biomarcador con utilidad tanto para el seguimiento clínico en tiempo real como para los resultados de la enfermedad, para los pacientes con múltiples cánceres sólidos entre los que figura el MM. La técnica diagnóstica más ampliamente usada para su valoración es la reacción en cadena de la transcriptasa inversa polimerasa cuantitativa que detecta múltiples antígenos moleculares asociados al MM. Es una técnica que presenta una alta sensibilidad diagnóstica y además tiene en cuenta la heterogeneidad tumoral. Esta técnica que cada vez es más reproducible, ofrece información traslacional acerca de la progresión tumoral, predicción de la respuesta al tratamiento y datos acerca de la supervivencia en los pacientes con MM. Los avances recientes del perfilado molecular y proteómico del MM, podrían implementar la información y la utilidad clínica aportada por las células circulantes tumorales. (37)

Por último, existen ciertas mutaciones genéticas que tienen una mayor importancia por su alta prevalencia y/o importancia pronóstica. Entre ellas, destacan BRAF y pTERT que se desarrollará más adelante en el apartado de genética y biología molecular del MM (apartado 4.3).

## 2.5 Factores y características histopatológicas del melanoma

Respecto a los factores histopatológicos, los hallazgos asociados a mal pronóstico se pueden clasificar en mayores y menores, según lo consistentemente con lo que se han asociado con el mismo, y quedan especificados en la tabla 5 (34):

Tabla 5. Factores histopatológicos que condicionan un peor pronóstico en el MM

MAYORES	MENORES
Valores elevados de espesor de Breslow*	Niveles de Clark elevados
Ulceración	Subtipo histológico diferente al melanoma de extensión superficial (MES) y LM
Índice mitótico elevado	Ausencia de linfocitos infiltrantes del tumor (TIL)
Invasión linfovascular	Regresión
	Invasión perineural

\*El más importante y con mayor valor pronóstico.

La importancia pronóstica de la regresión presenta cierta controversia mostrando distintos resultados en la literatura científica. En algunos estudios, especialmente de hace varios años, se relacionó un peor pronóstico. En esta línea, un estudio identificó la regresión intensa como un factor de riesgo para el desarrollo de metástasis en el caso de MM finos. (38)

Sin embargo, trabajos más recientes arrojan resultados diferentes. Otro grupo de investigación estudió el valor pronóstico de la regresión en una muestra de 664 pacientes y no encontró una asociación entre la presencia de esta y la SLP ni la SG. (39)

Por el contrario, otro estudio que incluía 2 grandes cohortes de pacientes (una de 17.271 pacientes de Países Bajos y otra de 4.980 pacientes de Australia) halló un mejor pronóstico en aquellos pacientes en estadios I y II que presentaron regresión, especialmente en los MM de espesor fino o intermedio y del subtipo de MES (40)

La regresión en el MM se inicia con un infiltrado inflamatorio, pero no es suficiente por sí sola para definir la presencia de regresión.

La presencia de inflamación en el MM nos indica de que se ha producido una respuesta inmunológica por el huésped frente al tumor y puede resultar efectiva si frena o detiene el crecimiento del tumor o simplemente no es efectiva y conduce a la regresión parcial o total del tumor.(41)

La regresión en sus fases iniciales podría condicionar un mejor pronóstico y sin embargo, en fases más tardías podría condicionar un peor pronóstico en términos de supervivencia. (41)

Un estudio sobre 201 casos de MM de espesor mayor a 0,75 mm a los que se les había hecho ganglio centinela demostró la ausencia de asociación entre la presencia de regresión y la positividad del ganglio centinela. (42)

Múltiples trabajos han descrito que la presencia de un infiltrado inflamatorio denso en el MM sin otros signos de regresión condiciona un mejor pronóstico en el melanoma. (41)

Conviene diferenciar según la densidad de la infiltración y la distribución de estos en 3 tipos: intensa (del inglés “brisk”) en el que los linfocitos se encuentran infiltrando toda la masa tumoral o a lo largo del margen de avance tumoral, leve/moderada (del inglés “non-brisk”) en el que los linfocitos se observan de forma aislada en el centro del tumor o salpicados en el margen de avance del tumor y ausente en el que no se observan linfocitos o si existen, éstos no interaccionan con los melanocitos tumorales. Estos subgrupos aportan información pronóstica en varios estudios.

En un estudio de 3.330 casos de MM se observó que la mortalidad específica por MM fue de un 30 y 50% respectivamente menor en los grupos con TIL leve y moderada en comparación con el grupo con ausencia de TIL. (43)

En otros trabajos se ha encontrado una asociación de los TIL con una buena respuesta a la inmunoterapia. Así, en un estudio de 94 cortes histológicos de MM previo al tratamiento con anti-PD1, observaron una mayor supervivencia y una mejor respuesta clínica al fármaco en aquellos casos con una infiltración intensa de linfocitos CD8 ( $P < 0.0001$ ). (44)

Por último, los subtipos de MM nodular (MN), desmoplásico y lentiginoso acral (MLA) se asocian con un peor pronóstico en comparación con el LM y el MES. (26)

### 2.5.1. Fases de crecimiento del melanoma

Durante la embriogénesis los melanocitos, derivados de la cresta neural, migran a la epidermis y a los folículos pilosos. Los melanocitos se distribuyen a lo largo de la membrana basal en una proporción de un melanocito por cada diez queratinocitos aproximadamente. Los melanocitos poseen dendritas que les permiten transferir los melanosomas a los queratinocitos vecinos, así como a los folículos pilosos.

Los nevos se componen de células névicas, que son melanocitos que han perdido los procesos dendríticos y proliferan de forma clonal para constituir nidos de células.

Los nevos comunes adquiridos comienzan como unas pequeñas placas planas (nevos de la unión) que con el tiempo se sobreelevan (nevos compuestos). Históricamente el concepto de la expansión de los nevos a la dermis se ha utilizado para explicar la transformación de un nevo de la unión a un nevo compuesto. Sin embargo, este concepto se ha cuestionado, pues existe una teoría alternativa que postula que la migración epidérmica de los nevos es la base de la formación de estos.

La mayoría de los MM surgen como unos tumores indolentes superficiales confinados a la epidermis donde permanecen durante meses, incluso años. Durante esta fase, conocida como fase de crecimiento radial, el MM es curable con una exéresis simple. En algún punto, y probablemente en relación con la acumulación de aberraciones genéticas, el MM se transforma en un nódulo expansivo que sobrepasa la membrana basal e invade la dermis, alcanzando la fase de crecimiento vertical. (45)

Aunque aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares de progresión del MM, la técnica de hibridación genómica comparada muestra hallazgos importantes. (46) De hecho, se han hallado algunas amplificaciones de genes en loci específicos que codifican para proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular, a su vez relacionadas con la adquisición de un potencial metastásico temprano en algunos tipos de MLA. Por el contrario, estas amplificaciones no son tan frecuentes en otros subtipos histológicos, o bien están presentes en las fases más tardías de la progresión. (47)

#### 2.5.1.1 Fase de crecimiento radial

Los MM en esta fase son finos, están confinados a la epidermis o tienen un mínimo componente dérmico, y tienen un comportamiento indolente. Incluye 2 patrones histológicos: el MMis y el MM maligno microinvasivo.

##### 2.5.1.1.1 Melanoma in situ

El Mis es un tipo de MM en fase de crecimiento radial, cuyos melanocitos se encuentran exclusivamente epidermis sin sobrepasar la membrana basal. De los cuatro subtipos fundamentales de MM, la variante in situ la presentan 3 de ellos: el MES, el MLA y LMM, pero no el MN, que de entrada es invasivo.

En la variante MES del MMis, los melanocitos malignos se extienden hacia arriba de su posición normal en la epidermis llegando a veces hasta el estrato córneo, proceso que se conoce como extensión pagetoide. El MLA in situ se caracteriza sin embargo por la distribución alineada y continuada a lo largo de la membrana basal de melanocitos dendríticos atípicos.

El LM se caracteriza por la presencia de una proliferación más o menos continua lentiginosa con extensión pagetoide en todo el espesor epidérmico. Cuando se vuelve invasivo se conoce como LMM.

##### 2.5.1.1.2 Melanoma in situ microinvasivo

Además de la afectación epidérmica, el MM microinvasivo se caracteriza por la extensión microscópica a la dermis papilar y tienden a presentar un comportamiento indolente. Por definición, el nido dérmico más grande no puede ser mayor que el nido epidérmico más grande y no se objetivan mitosis dérmicas. (48) A menudo presenta un infiltrado inflamatorio linfocítico y al contrario que el MM invasivo, la morfología de los melanocitos dérmicos es similar a los de la epidermis.

#### 2.5.1.2 Fase de crecimiento vertical

Este término incluye a todos aquellos MM que invaden y rellenan la dermis papilar o incluso la dermis reticular y el tejido celular subcutáneo. Estas características se corresponden con los niveles de Clark III, IV o V respectivamente. (49) Algunas lesiones con un nivel II de Clark se pueden considerar en fase de crecimiento vertical si existe algún nido dérmico de mayor tamaño que el más grande de la epidermis o si hay alguna mitosis dérmica.

Los MM en fase de crecimiento vertical pueden aparecer de novo o desde una fase de crecimiento radial. El tiempo desde que un MM en fase de crecimiento radial se hace invasivo y pasa, por tanto, a la fase de crecimiento vertical es muy variable. El MN no presentan fase de crecimiento radial

## CAPÍTULO I

previa, si no que directamente desde su origen se encuentran en fase de crecimiento vertical. La probabilidad que tiene un MM invasivo de metastatizar se relaciona principalmente con el grosor de la lesión en milímetros desde la capa granular de la epidermis hasta el punto más profundo de la invasión (índice de Breslow). (50)

### 2.5.2 Subtipos histológicos clásicos de melanoma

En la tabla 6 sintetizamos los rasgos histopatológicos más característicos. (51)

Tabla 6. Subtipos histológicos de MM.

	MES	LMM	MLA	MN
Patrón de crecimiento radial	Paqueteoide difuso	Lentiginoso	Lentiginoso	AUSENTE*
Tipo celular predominante en la zona de crecimiento radial	Epitelioide	Epitelioide, fusiforme y dendrítica (raro)	Fusiforme, epitelioide o dendrítica	No aplica
Epidermis en la zona de crecimiento radial	Normal a hiperplásica	Atrófica	Hiperplásica	No aplica
Tipo celular predominante en la zona de crecimiento vertical	Epitelioide	Fusiforme y epitelioide	Fusiforme y epitelioide	Epitelioide
Desmoplasia	Rara	Frecuente	Frecuente	Rara
Neotropismo	Raro	Frecuente	Frecuente	Raro
Regresión	A veces regresión parcial	Frecuente	Variable	Rara
*Por definición de consenso, se admite la extensión intraepidérmica hasta un máximo de 3 crestas más allá del nódulo tumoral.				

### 2.5.3 Variantes histológicas menos comunes

A veces el diagnóstico clínico e histológico de un MM se convierte en un desafío y puede suceder que el MM se asemeje a lesiones benignas u a otro tipo de lesiones malignas de estirpe no melanocítica. Se han descrito más de 17 variantes de MM en las últimas décadas. Se describen a continuación las tres más características:

#### 2.5.3.1 Melanoma nevoide

Se confunde frecuentemente con un nevo intradérmico benigno por su aspecto parecido tanto desde el punto de vista clínico como histológico.

Histológicamente el componente dérmico es hipercelular, suele presentar hiperchromasia y presenta un fenómeno que se conoce como pseudomaduración por el que las células nevoideas disminuyen de tamaño conforme se profundiza en el espesor vertical del tumor. Sin embargo, la celularidad suele ser hiperchromática, claramente atípica y presenta abundantes figuras de mitosis. (52) Existen a su vez dos variantes; el MM spitzoide compuesto por células grandes y epitelioides y otra variante con células más pequeñas de aspecto nevoide. (53)

### 2.5.3.2 Melanoma desmoplásico

No es rara la confusión clínica con una cicatriz, con un fibroma o incluso con un epiteloma basocelular porque se presenta clínicamente como un nódulo o una placa tumoral de aspecto carnoso. (54) Una clave diagnóstica clínica es la presencia de un nódulo dérmico con pigmento en su periferia. Tienden a aparecer en zonas fotoexpuestas, típicamente el cuello, la cabeza o la parte superior de la espalda de individuos de una edad avanzada.

Histológicamente se caracterizan por poseer un estroma fibromixoide y una mala delimitación lateral. Las células malignas tienen unos núcleos hiperchromáticos y alargados, y tienden a agruparse con una disposición habitual en fascículos o bien, menos frecuentemente, a estar dispersas de forma aislada. Estas células muestran a menudo un neurotropismo y, en ocasiones, se observan algunos focos de linfocitos y mucina en la dermis. (55) Se considera una variante de peor pronóstico. (26)

### 2.5.3.3 Melanoma dérmico solitario

Es una lesión confinada a la dermis y/o al tejido celular subcutáneo sin un componente epidérmico. En realidad, no se sabe exactamente se trata de una lesión primaria, una metástasis dérmica de un MM primario desconocido o una lesión en la que ha regresado el componente epidérmico. (56)

## 3. Genética y biología molecular del melanoma

El conocimiento cada vez mayor de la biología del melanocito y de la patogénesis del MM ha conducido al desarrollo constante de terapias dirigidas y a la mejora de los cuidados de los pacientes con MM avanzado.

### 3.1. Biología del melanocito

Los melanocitos derivan de células madre pluripotenciales de la cresta neural. El desarrollo del melanocito está modulado por 2 factores: el gen KIT y el gen del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF). Por ello, no es de extrañar que en una proporción de MM estos dos factores constituyen oncogenes mutados o amplificados. (57)

La hormona estimulante de alfa-melanocitos o melanotropina (MSH) es un péptido propigmentario que estimula al receptor de la melanocortina 1 (MC1R) situado en la superficie de los melanocitos. (58) Existen muchas variantes o polimorfismos del gen MC1R, algunas de las cuales son responsables del fenotipo pelirrojo/piel clara que se relaciona con un aumento del riesgo de MM y de otros cánceres de piel no MM. (59)

MC1R activa la expresión de MITF que estimula la transcripción de múltiples genes que participan en la conversión de tirosina a pigmentos de melanina. La estimulación de la pigmentación cutánea tras la exposición a luz ultravioleta ocurre mediante el daño del ADN del queratinocito, la inducción de la expresión de proopiomelanocortina (POMC), la secreción de MSH y la estimulación del MC1R en los melanocitos epidérmicos. (60)

### 3.2 La evolución genética del melanoma desde las lesiones precursoras

Se dispone de un estudio de la revista “New England Journal of Medicine” (45) sobre 150 áreas de 37 MM primarios que tenía el fin de determinar la presencia de mutaciones y tratar de establecer el orden de la ocurrencia de estas. El espectro histopatológico de estas áreas iba desde unas lesiones benignas inequívocas, pasando por unas lesiones atípicas de malignidad intermedia, MM intraepidérmicos y MM invasivos. Cada área se secuenció para 293 genes con relevancia oncológica.

Las lesiones precursoras estaban relacionadas con mutaciones de los genes de la vía de las proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las lesiones benignas inequívocas mostraban exclusiva y frecuentemente la mutación V600E en el gen BRAF mientras que aquellas caracterizadas como intermedias presentaban a menudo las mutaciones del gen NRAS y otras mutaciones conductoras. Un total del 77% de las áreas de las lesiones intermedias y de los MMis portaban la mutación en el promotor del gen de la transcriptasa inversa de telomerasa (pTERT), lo que indica que estas últimas mutaciones surgen en estadios tempranos de la progresión oncológica. Otras mutaciones ocurren más tarde en la progresión de la lesión como la inactivación bialélica de CDKN2A y las alteraciones en el número de copias, que se detectaron en los MM invasivos.

Adicionalmente, las mutaciones en los genes PTEN y TP53 ocurrían en los MM primarios avanzados. La influencia de la radiación ultravioleta se detectó en todos los estadios, siendo un factor fundamental tanto en la iniciación como en la progresión del MM.

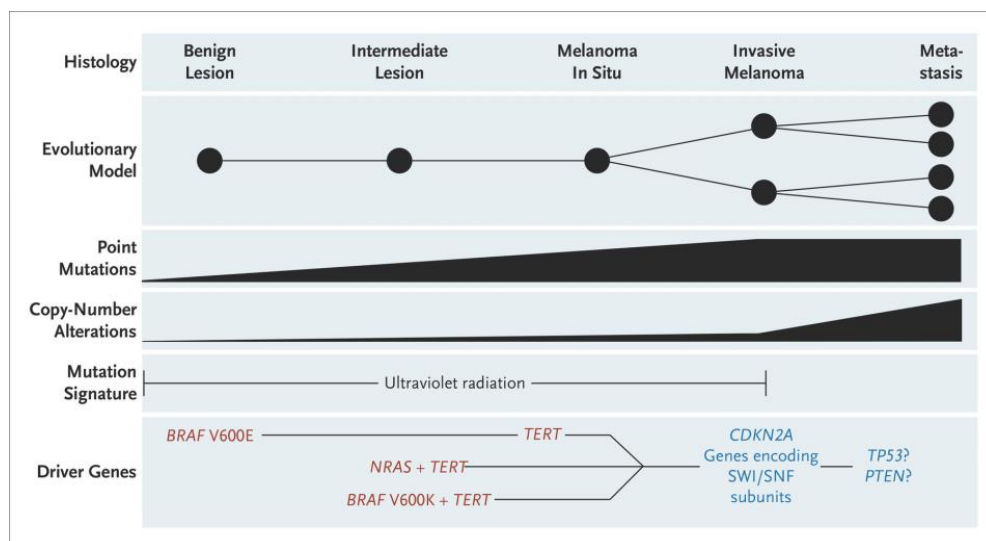


Figura 7 Evolución genética del melanoma desde las lesiones precursoras. Fuente Hunter Shain A y colaboradores. (45)

### 3.3. Vía MAPK

La vía MAPK está activada de forma constitutiva en casi todos los MM. (61) En las células no malignas se requiere la interacción entre un factor de crecimiento y su ligando para activar esta vía que conlleva a una serie de eventos que definitivamente promueven el crecimiento y la supervivencia. La familia de proteínas RAS constituye un mediador crítico en la transducción de señales en esta vía.

El “Cancer Genome Atlas” (TCGA) es un proyecto creado por las instituciones americanas “National Insitute of Cancer” (NCI) y el “National Human Genome Research Institute” que tiene como objetivo caracterizar molecularmente y analizar datos genómicos, epigenéticos, transcriptómicos y proteómicos de diversos cánceres, entre los que figura el MM.

Las mutaciones de tipo “hot spot” o puntos calientes de mutación son regiones del genoma donde se concentra un número inusual de mutaciones. El proyecto TCGA ha identificado mutaciones de tipo “hot spot” en el gen NRAS hasta en un 25-30 % de los MM cutáneos. (62)(63) Una mutación somática en el gen NRAS puede causar la activación constitutiva y continuada de la proteína NRAS, lo que lleva a su vez a la activación seriada de las serina/treonina quinasas que promueven la progresión del ciclo celular, la transformación y finalmente el aumento de la supervivencia celular. Además, esta cascada puede estar mediada por la sobreexpresión y/o la hiperactivación de múltiples receptores del factor del crecimiento, entre los que destacan c-Met, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y KIT, así como por la pérdida de función del gen supresor tumoral NF1 que en condiciones normales actúa suprimiendo la señalización NRAS. (64) De hecho, la mutación NF1 es bastante frecuente en el MM cutáneo, así entre un 13-14% de los casos presentan la mutación. (62,63)

Los mediadores más importantes de RAS activado son las quinasas de serina/treonina BRAF y CRAF que se activan tras la unión de RAS. Para el funcionamiento de la vía MAPK, y en contraposición con la activación de BRAF cuya activación por sí sola es suficiente, la activación de la vía de CRAF requiere múltiples pasos adicionales. Esto puede explicar por qué la mutación activadora en el dominio BRAF quinasa está presente en el 40 al 50% de los pacientes con MM y, sin embargo, no hay descritas mutaciones activadoras de CRAF. (64)

Después de su activación, RAF, en forma de homo- o de heterodímero inicia la fosforilación de MEK que conlleva a su vez a la fosforilación y activación de ERK que desencadena una señal de crecimiento y transformación constante mediante la proliferación (ciclina D, RBL2), la supervivencia (Bim, MCl-19) y la diferenciación celular. (64)

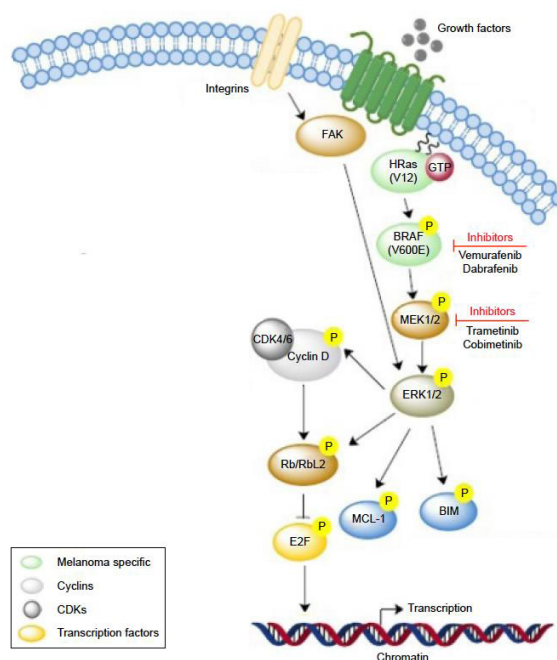


Figura 8 Esquema de la vía MAPK. Fuente Chowday y colaboradores. (65)

### 3.3.1 Prevalencia de las mutaciones BRAF y NRAS

Se piensa que las mutaciones en el gen BRAF no ocurren en etapas tan tempranas de la melanogénesis, apareciendo algo más tarde en las fases iniciales del MM invasivo. Existe cierta evidencia al respecto:

- Las mutaciones en BRAF son frecuentes en los nevos melanocíticos, el MM en la fase de crecimiento vertical y en el MM metastásico (70-80%, 40-50% y 40-50% respectivamente). Sin embargo, raramente se detectan en el MMis y en el MM en la fase de crecimiento radial (10% y 6% respectivamente) (64,66,67)
- En los nevos melanocíticos atípicos y en los MM primarios se ha observado policlonalidad (por ejemplo, células mutadas en BRAF mezcladas con células BRAF wild type), por el contrario, tal policlonalidad no se ha objetivado en las metástasis de MM ni en los casos de MM primario en más de una localización. (68,69)

Las mutaciones en NRAS, aunque no tan frecuentes como en BRAF, son bastante prevalentes en el MM (15-20%). Tanto una como otra son más habituales en los MM cutáneos que aparecen en áreas sin signos histológicos de daño solar crónico que aquellos que aparecen en localizaciones con daño solar crónico.

Excepto en raros excepcionales, las mutaciones activadoras de BRAF, NRAS suelen ser mutuamente exclusivas. (70)

### 3.3.2 Implicación pronóstica de las mutaciones en BRAF y NRAS

Respecto al valor pronóstico de la mutación en BRAF o NRAS, hay cierta controversia y disponemos estudios con hallazgos dispares en la literatura científica.

Un trabajo que incluyó a 912 pacientes con MM halló que aquellos con mutaciones en los genes NRAS o BRAF se asociaban con un estadio tumoral más alto al inicio, lo cual indicaba que los MM en estadios iniciales de bajo riesgo y curables quirúrgicamente eran con más frecuencia MM sin mutaciones en dichos genes [NRAS “wild type” (NRASwt)/BRAF “wildtype” (BRAFWt)].

Asimismo, hallaron tres veces más riesgo de muerte en los grupos de pacientes NRAS+ y BRAF+ en comparación con los grupos NRASwt y BRAFWt. Este último hallazgo se observó únicamente en el grupo de pacientes con MM de alto riesgo después de ajustar por múltiples variables (edad, sexo, localización, estadio de la AJCC, grado de TIL y centro de procedencia). (43)

Otro estudio de 147 casos de MM en estadios I y II detectó una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en los casos BRAF+ respecto a los BRAF-. Tras ajustar por las variables espesor de Breslow, presencia de ulceración, edad, sexo, localización e índice mitótico, la mutación BRAF constituyó un factor de riesgo para una peor supervivencia libre de enfermedad. (71)

Sin embargo, en otro trabajo de 217 pacientes con MM, los casos con mutaciones en BRAF mostraron una tendencia hacia una mejor supervivencia global y relativa. Por el contrario, los casos con mutaciones en NRAS mostraron metástasis ganglionares tempranas y metástasis a distancia con mayor frecuencia. Además, la mutación en NRAS fue un factor independiente de riesgo para la progresión de la enfermedad en el análisis multivariado. (72)

Por último, un estudio que contenía 332 casos de MM no obtuvo ningún resultado significativo en cuanto al valor pronóstico de la mutación en BRAF o NRAS. (73)

### 3.3.3 Caracterización histológica de los MM con mutación en BRAF y NRAS

Viros y colaboradores (7) en su estudio sobre 302 casos de MM, trataron de correlacionar algunas variables histopatológicas con las mutaciones en BRAF y NRAS.

Describieron que los MM mutados en BRAF se asociaban con más frecuencia a algunas características histológicas específicas, a diferencia de aquellos MM mutados en NRAS, en los que no encontraron hallazgos histológicos característicos.

Los MM con mutación en BRAF presentaban con más frecuencia una extensión pagetoide, la formación de nidos de melanocitos intraepidérmicos, un mayor engrosamiento de la epidermis afectada y una mejor delimitación de la piel de alrededor de la lesión. Además, las células eran más grandes, redondeadas y más pigmentadas que las de aquellos casos de MM que carecían de la mutación BRAF. (7)

Posteriormente un grupo integrado por algunos investigadores del estudio anterior obtuvieron unas conclusiones parecidas, aunque la fuerza de la asociación fue más débil respecto a algunas variables como la extensión pagetoide y la tendencia a formar nidos. (74)

### 3.4 Importancia de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT)

En 1961, Leonard Hayflick demostró que, en cultivo celular, las células fetales humanas podían dividirse entre 40 a 60 veces antes de entrar en la fase de ausencia de división celular o senescencia. En base a lo anterior, el límite de Hayflick es el número de duplicaciones que puede sufrir una célula eucariota antes de entrar en senescencia. (75)

Años más tarde, los ganadores del Premio Nobel, Elizabeth Blackburn, Jack Szostak y Caroline Greider, descubrieron un mecanismo que explicaba el límite de la replicación celular y consistía en que los telómeros se acortaban en cada ciclo de división celular. (76,77)

Hoy día, bien es conocido que los telómeros son complejos de nucleoproteínas situados al final de cromosomas eucariotas consistentes en múltiples repeticiones de la secuencia de bases nitrogenadas de ADN TTAGGG.

La principal función de los telómeros es preservar la integridad de los cromosomas y la estabilidad genética. (78) En cada división celular, el ADN telomérico disminuye por lo que los telómeros son cada vez más cortos. En un momento dado, esta pérdida da lugar a una parada en la división celular que conduce a la senescencia. (79)

Para conseguir la inmortalidad, las células necesitan superar la barrera telomérica. Hay básicamente dos vías para mantener la longitud de los telómeros y ambas dos activan a la enzima telomerasa. La primera vía es mediante una ribonucleoproteína polimerasa que alarga los telómeros añadiendo repeticiones en tándem de 5'-TTAGGG-3' a la zona terminal del cromosoma. La segunda vía es mediante un mecanismo no dependiente de telomerasa conocido como ALT ("alternative lengthening of telomeres"). (80)

La reactivación de la telomerasa está presente en aproximadamente un 90% de los cánceres en humanos y permite a las células cancerígenas mantener la longitud de los telómeros. (81) Por el contrario, los 10 a 15% casos restantes de cáncer no tienen actividad detectable de la telomerasa y se cree que al menos algunos de ellos la elongación de telómeros sería debida al mecanismo ALT. (80)

Un estudio del fenotipo ALT en 6.110 tumores primarios de 94 tipos de cáncer, halló la presencia de la huella ALT en el 3,7% de todos los tumores, sin embargo, no lo detectaron en lesiones benignas y tejidos normales. (82)

Más tarde, el mismo grupo de investigadores demostraron que tanto las mutaciones en los genes ATRX como las DAXX estaban muy relacionadas con el desarrollo de ALT en tumores pancreáticos endocrinos, mientras que las mutaciones ATRX estaban relacionadas con el fenotipo ALT en tumores del sistema nervioso central. (83)

Como excepción existen algunas células normales que tienen aumento de la actividad telomerasa, concretamente las células germinales y las células madre de los tejidos auto regenerativos. (78)

El complejo de la telomerasa contiene múltiples componentes, siendo los más importantes, el ARN (TERTC), la subunidad catalítica de la telomerasa transcriptasa inversa y la diskarina (DKC1).

Se ha demostrado que en las células telomerasa-negativas, como las células epiteliales o los fibroblastos, la enzima TERT es el único componente necesario para reestablecer la actividad del complejo de la telomerasa. El gen TERT se localiza en el cromosoma 5 e incluye 16 exones. El promotor core del gen TERT (pTERT) contiene 330 pares de bases “upstream” del punto de partida y se localiza en una zona rica en GC. (84)

La adquisición de mutaciones en el pTERT se ha postulado como un mecanismo clave para el mantenimiento de la regulación al alta en los cánceres humanos, concretamente para mantener la capacidad del crecimiento celular infinito. Éstas condicionan un aumento de la expresión de TERT, un incremento de los niveles de la telomerasa y finalmente conducen a la inmortalidad celular. (85)

En lo que respecta al riesgo de MM, se ha documentado una relación entre una mayor longitud de los telómeros y un mayor número de nevos por paciente, así como el riesgo de padecer MM. (86) (84)

Asimismo un estudio de 1.469 casos de MM y 1158 controles pareados detectó que la longitud de los telómeros fue mayor y que el acortamiento de los telómeros por la edad fue más rápido en los casos que en los controles. Además encontraron una asociación entre una mayor longitud de los telómeros y el riesgo de padecer MM, con un mayor impacto en el grupo de edad de los 30 a los 35 años. (87)

Hay distintos tipos de mutación en el pTERT según el locus de esta. En el MM las más prevalentes son la -146C>T y la -124C>T, siendo la primera la más frecuentemente descrita hasta el momento. Existen otras alteraciones somáticas descritas presentes en una menor frecuencia, que constituyen cambios en tándem CC > TT en las posiciones -124/-125 y -138/-139 bp. (88)

La actividad de la telomerasa tiende a aumentar con la existencia y la malignidad de las lesiones melanocíticas, en orden creciente desde piel sana al nevo benigno, pasando por el nevo displásico y, finalmente, donde es mayor, en el MM. (84)

Las mutaciones en el pTERT raramente se encuentran en los nevos melanocíticos. En base a este hecho, existe un estudio que pretendía analizar si la presencia de la mutación del pTERT podía ser una herramienta diagnóstica útil para diferenciar MM de nevo melanocítico. Así, se analizó la presencia de la mutación en el pTERT en una muestra de 86 MM primarios, 72 nevos melanocíticos y 40 lesiones melanocíticas de significado incierto.

De los 86 MM, 67 (77,9%) fueron pTERT positivos e incluían alguna de las mutaciones siguientes: -124C>T, -124\_125CC>TT, -138\_139CC>TT, o -146C>T.

De los nevos melanocíticos solo 1 (1,4%) fue pTERT positivo. Y de las 40 lesiones melanocíticas de significado incierto solo 2 (5%) fueron pTERT positivas. Con estos resultados los autores postularon que la detección de la mutación como test diagnóstico para diferenciar MM frente a nevo tenía una precisión diagnóstica del 87.3% (IC al 95%= 81.1-92.1). Asimismo, sugirieron que el hallazgo de la mutación en aquellas lesiones que presentan dudas diagnósticas respecto a malignidad en el examen histopatológico debe inclinar la balanza hacia la malignidad, por tanto, al diagnóstico de MM. (89)

### 3.4.1 Prevalencia y pronóstico de la mutación en pTERT

Las mutaciones en pTERT junto con las mutaciones en BRAF, constituyen las mutaciones somáticas más frecuentes en el MM (en torno a un 40% de los casos). En líneas generales las mutaciones en pTERT se han asociado con un pronóstico más sombrío y en varios trabajos se han descrito peores tasas de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia específica en pacientes con mutación en el pTERT. (3,90)

Así un metanálisis reciente que analizó 19 artículos que incluían en torno a 2500 casos describió una peor supervivencia global en los MM pTERT+, así como un mayor espesor de Breslow. (2)

Un trabajo que incluyó 563 casos de MM primario encontró una prevalencia de la mutación en pTERT del 48,3%. Los subtipos detectados más frecuentes fueron en orden decreciente: -146 C>T, -124 C>T, y -138\_139 CC>TT.

Fueron más frecuentes en tumores de cabeza y cuello y menos en localizaciones acrales. La presencia de la mutación en pTERT se asoció significativamente con elastosis intensa, daño solar y aumento del número de léntigos en la zona corporal de MM, aumento de queratosis seborreicas, y mayor espesor de Breslow. Asimismo en el análisis multivariado se asoció de forma independiente con un mayor índice mitótico. Asimismo evaluaron el impacto sobre el pronóstico de la presencia de las mutaciones NRAS, pTERT, y BRAF, así como sus combinaciones y hallaron que el grupo con el peor impacto en la supervivencia fue NRAS+/pTERT+, seguido de NRAS+, BRAF+/pTERT+, pTERT+, y por último BRAF+. (5)

En el estudio de Griewank y colaboradores analizaron 410 MM primarios (90) y hallaron una prevalencia de la mutación en el pTERT similar a la de estudios previos (43%). La frecuencia de la mutación varió según los subtipos de MM, siendo más frecuente en aquellos MM de piel no acral (48%) y en metástasis de MM con primario desconocido (50%) y fue menos frecuente en MM de mucosas (23%) y acral (19%). Además, la presencia de mutaciones en el pTERT se asoció con la mutación BRAF y NRAS y un mayor espesor de Breslow. Por último, la mutación en el pTERT fue un factor independiente de mal pronóstico y mostró una menor supervivencia en el grupo de MM no acrales cutáneos.

Un estudio de 287 casos de MM no-acral en estadios I/II trató de evaluar el impacto pronóstico de los subtipos de mutaciones en el pTERT. De los tres tipos de mutación en el pTERT analizados se observó en el análisis multivariado que la mutación en tándem -138/-139 CC> TT acarreaba el peor pronóstico en términos de supervivencia. En particular este efecto era más notable si se asociaba a la mutación BRAF/NRAS. Postularon que la mutación en tándem podría conllevar a una mayor inestabilidad genómica que las mutaciones habituales (146C>T y la 124C>T) (88)

Siguiendo esta línea, se ha analizado la importancia de diferentes polimorfismos en la región del pTERT y concretamente la variante rs2853669 podría tener cierto carácter protector en términos de pronóstico y supervivencia en el MM. De esta forma, un trabajo objetivó que aquellos casos de MM con ausencia del alelo del polimorfismo rs2853669 tuvieron peor supervivencia específica que los que portaban la variante de este. (3)

Tras conocer la importancia del promotor de TERT tanto por su comportamiento en el desarrollo y crecimiento tumoral, así como por la alta prevalencia de mutaciones que asocia y, por último, por su implicación pronóstica en términos de supervivencia, resulta interesante analizar desde el punto de vista histológico el grupo de MM con mutaciones en el pTERT y de forma secundaria sus características histológicas según la concurrencia con mutaciones en el gen BRAF.

## CAPÍTULO 5

## *05. Hipótesis*

## CAPÍTULO 5

## HIPÓTESIS

Junto con las mutaciones en BRAF y NRAS, las mutaciones en el promotor de TERT son las mutaciones somáticas más frecuentes en el melanoma. Hay algunas características histológicas que se asocian a la mutación BRAF, pero aún se desconoce si ocurre lo mismo en los melanomas con la mutación en el promotor de TERT. Dado el comportamiento biológico diferente que tienen los melanomas con mutaciones en el promotor de TERT, es posible que los tumores tengan características histológicas distintivas.



## *06. Objetivos*

---

## CAPÍTULO 6

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo principal

Identificar hallazgos histológicos característicos del melanoma con mutación en el promotor del gen TERT

### 2 Objetivos secundarios

1. Realizar un estudio de concordancia interobservador para establecer la reproducibilidad de las variables histológicas del melanoma
2. Identificar las características histológicas asociadas a los grupos definidos según la presencia o no de mutaciones tanto en el promotor de TERT como en BRAF (TERT+ BRAF-/TERT+BRAF+/TERT-BRAF-/TERT-BRAF+)

## CAPÍTULO 7

# ***07. Materiales***

---

El presente trabajo se compone de 2 estudios:

El estudio 1 tenía como objetivo definir las variables del estudio 2, así como establecer su reproducibilidad.

Para la selección de las variables histológicas, se incluyeron, por un lado, las variables definidas por los autores Viros y colaboradores en su trabajo (7) y, por otro lado, otras variables adicionales que consideramos relevantes.

De cualquier modo, se revisó la reproducibilidad mediante un estudio interobservador de tipo observacional, transversal, retrospectivo y descriptivo.

El estudio 2 tuvo como objetivo principal establecer la caracterización histológica de los MM mutados en el pTERT y, de forma secundaria, analizar si las características histológicas eran diferentes según la presencia de mutaciones en BRAF y/o pTERT. A tal efecto, los casos se clasificaron según tuvieran o no alguna mutación patogénica en pTERT, y de esta forma se establecieron 2 grupos, pTERT+/pTERT-. Para el análisis secundario con las posibles combinaciones derivadas de la presencia de alguna mutación patogénica en pTERT o BRAF se obtuvieron 4 grupos: pTERT-/BRAF-, pTERT+/BRAF-, pTERT+/BRAF+, pTERT-/BRAF+. El estado mutacional estaba registrado en la base de datos y su determinación fue realizada por secuenciación Sanger y PCR según la metodología descrita en el anexo 1.

Con tal fin, se realizó un estudio con un diseño observacional, transversal, de carácter retrospectivo y descriptivo.

### 1. Esquema de trabajo



Figura 9 Estructura de la tesis

### 9. Contexto y participantes

Para los 2 estudios todos los casos seleccionados eran MM invasivos incluidos en la base de datos de MM del Servicio de Dermatología del Instituto Valenciano de Oncología.

Los cortes histológicos se obtuvieron de forma consecutiva de los archivos de anatomía patológica del IVO del periodo comprendido desde de enero de 2004 hasta enero de 2017.

La Fundación Instituto Valenciano de Oncología (IVO) es una entidad privada sin ánimo de lucro. Además, es uno de los primeros centros monográficos de cáncer que se abrieron en España y, desde su inauguración en 1976, ha sido pionero en el tratamiento de los procesos oncológicos. En la Comunidad Valenciana es el único de sus características y supone un centro de referencia nacional e internacional en el tratamiento del MM.

La base de datos de MM se creó en el año 2000 y desde entonces se han introducido datos epidemiológicos, clínicos e histológicos de los pacientes de forma prospectiva desde la primera visita en la consulta de dermatología.

Toda la información de la base de datos de melanoma se ha procesado de forma uniforme desde el inicio por el mismo clínico investigador (Dr. Eduardo Nagore).

Las muestras evaluadas fueron laminillas que incluían cortes de 5 micras teñidos con hematoxilina y eosina, siguiendo procedimientos estandarizados, obtenidos a partir del bloque de parafina donde se almacenaba el tumor primario.

Se obtuvo la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del IVO, el documento de aprobación se recoge en el anexo 2.

El documento de consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación obtenidas en el curso de procedimientos quirúrgicos, terapéuticos o diagnósticos se recoge en el anexo 3.

Por último, se recogió el consentimiento informado de todos los pacientes que participaron en los estudios (anexo 4).

### 10. Criterios de inclusión

MM en estadio I o superior

Disponer de una muestra tumoral representativa para su análisis (bloque)

Disponer de datos de la mutación respecto a pTERT

11. Criterios de exclusión

MM primario extracutáneo  
MM con tumor primario de localización desconocida  
MMis o microinvasivo  
MM de mucosas

12. Variables recogidas en la base de datos de MM del IVO

Las variables se recogen y describen en detalle en el anexo 5.

13. Descripción de los estudios

11.6.1 Estudio 1: Establecimiento de las variables del estudio mediante un estudio de concordancia interobservador

11.6.1.1. Esquema del trabajo realizado en el Estudio 1

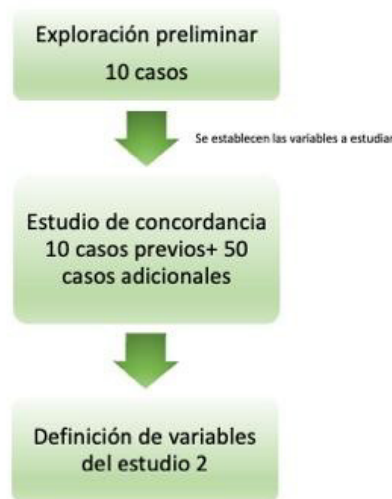


Figura 10 Esquema del trabajo 1.

11.6.1.2 Equipo clínico y procedimiento de revisión

Nuestro estudio se llevó a cabo por dos grupos de investigadores, el primero compuesto por un dermatopatólogo y un dermatólogo de la misma institución [Instituto Valenciano de Oncología, (IVO) (OS y EN), Valencia] y el segundo compuesto por un patólogo (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid) (JLRP) y una dermatóloga (Hospital de Manises, Valencia) (VSM).

Basados en la experiencia clínica de los investigadores se realizó una exploración preliminar que tenía como objetivo incluir variables histológicas adicionales a las ya consideradas por la literatura científica en estudios previos para el estudio de concordancia interobservador.

Cada grupo recibió un cuaderno de investigador en papel con la definición de las variables del estudio para poder consultarlo durante la valoración de los casos. Durante este procedimiento se desconocían las características demográficas clínicas, así como el estado mutacional, tratándose los cortes histológicos de forma pseudoanonimizada. Los cuadernos usados en el estudio se muestran en el anexo 6.

Además, se proporcionaron hojas en papel para la recogida de datos codificadas mediante un número. Posteriormente los datos se exportaron a una tabla Excel (Microsoft versión 16.43).

Aquellas variables que no pudieron evaluarse se consideraron como “no aplicable”. Aquellos cortes que no eran óptimos para su valoración por cualquier motivo (deterioro, mala tinción, rotura de cristal) se excluyeron del trabajo. Las hojas de recogida de datos se muestran en el anexo 7.

### 11.6.2. Características histopatológicas

En las sucesivas rondas se valoraron las características que se enumeran a continuación. Las variables desde la 1 a la 7 son las definidas en el estudio de Viros et al. (7).

#### 1. Extensión pagetoide

Hace referencia a la presencia de los melanocitos por encima de la membrana basal, ya sea formando nidos o de forma aislada. Se clasificó según la cantidad en 4 grados (0=100% melanocitos en unión dermoepidérmica, 1=75-100% melanocitos en unión dermoepidérmica, 2=50% extensión pagetoide, 3=más de un 50% de extensión pagetoide).

#### 2. Formación de nidos intradérmicos

Los nidos intradérmicos están constituidos por agregados de 5 o más células, ya sea en la membrana basal o en estratos epidérmicos más altos. Se clasifica según la proporción de melanocitos que se encuentran formando nidos en 4 grados (0=ausencia de nidos, 1=menos del 25% de melanocitos en nidos, 2= 25-50% de los melanocitos en nidos, 3= más del 50% de los melanocitos en nidos).

#### 3. Pigmentación de los melanocitos

Se cuantificó el pigmento melánico en el interior de los melanocitos a través de objetivos de 20X y/o 40X. Los melanófagos quedaron excluidos de la valoración. Se determinó en la zona más pigmentada de todo el tumor. Se clasificó según cantidad en 5 grados (0=ausencia de pigmento, 1=leve, 2=moderado, 3=alto, 4=muy alto).

4. Distribución del pigmento

Se clasificó independientemente de la intensidad de pigmento por el tamaño del área pigmentada del tumor. Se clasifica según la extensión del área pigmentada en 3 grados (0=ausente, 1=localizada, 2= extensa).

5. Contorno epidérmico

Se comparó el grosor epidérmico de las zonas laterales de crecimiento radial del melanoma con el grosor de la piel normal adyacente. Se clasificó en 5 tipos (0=atrófico, 1= adelgazado, 2=normal, 3=engrosado, 4=hipertrófico).

6. Delimitación lateral

Se observó la transición de la epidermis en la zona periférica tumoral a la piel normal. Se clasificó en 3 tipos (0=discontinua, 1= gradual pero continua, 2= abrupta).

7. Morfología celular

Se determinó la morfología celular en la zona más celular del tumor y a través de objetivos de 20X. Se clasificó en 5 tipos (0= redondeada, 1=ovoide, 2=elongada, 3= fusiforme, 4=sin predominio).

8. Patrón de crecimiento

En analogía con otros tumores cutáneos se definen 2 patrones a pequeño aumento. El patrón expansivo posee una morfología habitualmente redondeada y empuja el estroma tumoral, sin embargo, el patrón infiltrativo muestra unos límites peor definidos y disecciona los haces de colágeno del estroma. Se clasificó en 3 tipos (0=Sin predominio, 1=expansivo, 2=infiltrativo).

9. Elastosis solar

Es una característica derivada del daño que produce la radiación ultravioleta en la dermis. Se observa la presencia de un material azul-grisáceo con la tinción de hematoxilina y eosina, denominado elastótico, consecuencia de la degeneración de las fibras elásticas y que sustituye de una forma variable al colágeno normal. Inicialmente son de un grosor normal, pero en casos de elastosis más marcada se engruesan hasta formar ovillos, incluso en fases avanzadas se observan masas de material amorfo elastótico. Se realizaron 2 clasificaciones, de acuerdo con una clasificación descrita previamente, con aumentos de 100X y 200X. La primera, incluyó 4 grados de elastosis solar: 0=ausencia de fibras elásticas, 1=mínima, 2=moderada, 3=alta, la segunda, en 2 grados 0= non chronic sun induced damage” (NON-CSD), 1= “chronic sun damage” (CSD). (91)

### 10. Ulceración

La ulceración se define como la interrupción epidérmica en todo su grosor en una zona específica con una reacción acompañante característica (depósito de fibrina, neutrófilos) La piel adyacente suele mostrar adelgazamiento, aplanamiento o hiperplasia reactiva. Se clasificó en 2 grados según la presencia o ausencia (0=ausente y 1=presente). (92)

### 11. Tipo de ulceración.

Se evaluó la presencia de 2 tipos diferentes de ulceración tumoral no traumática. La ulceración infiltrativa, en la que las células tumorales invaden y erosionan la epidermis y la ulceración expansiva, en la que el crecimiento nodular empuja la epidermis y la adelgaza hasta romperla. Se definieron 3 categorías: 0= Ausencia, 1= expansiva, 2= infiltrativa. (92)

### 12. Presencia de morfología polipoide

La morfología polipoide se considera una variante exofítica del MN en el cual la mayor parte del volumen del tumor se localiza sobre la superficie de la piel y suele ser pediculado o sésil. (93,94)

Se clasificó en 2 grados según la presencia o ausencia (0=ausente y 1=presente).

### 13. Regresión

Tal como describieron la Dra. Requena y colaboradores (41), se establece cuando: “El estroma fibroso reemplaza progresivamente la parte central del tumor. A medida que esto ocurre, los melanocitos comienzan a desaparecer y empiezan a aparecer linfocitos y vasos sanguíneos neoformados. En las fases iniciales de la regresión se observan fenómenos inflamatorios. La fibrosis todavía no se aprecia pues aparece en estadios tardíos, pero pueden observarse melanófagos y vacuolas en la membrana basal de la epidermis. Puede haber fisuras en la unión dermo-epidérmica y es habitual encontrar queratinocitos necróticos o melanocitos que aparecen como células pequeñas, redondeadas y eosinofílicas (cuerpos de Civatte) en la base de las crestas epidérmicas. En las fases más tardías de la regresión, la epidermis se vuelve atrófica, aún pueden observarse algunos melanocitos no atípicos y en ocasiones se visualiza hiperplasia melanocítica y melanocitos atípicos en la unión dermo-epidérmica. En la dermis papilar se observa una fibrosis y un edema en grado variable, así como neovascularización o dilatación vascular junto con melanófagos y algunos linfocitos.” Se clasificó según la intensidad (0= ausencia, 1=leve, 2=marcada)

14. Presencia de necrosis

La necrosis se consideró significativa cuando un área de al menos un cuarto de un campo a gran aumento estaba ocupada por células necróticas y leve cuando aparece algún agregado de al menos 5 células. Los casos con agregados de menos de 5 células necróticas se consideraron negativos. (95)

Se clasificó en 2 grados (0= ausente, 1= presente).

15. Presencia de pleomorfismo

El pleomorfismo es un término usado en histología y citopatología para describir variabilidad en el tamaño, la forma y la tinción de las células y/o sus núcleos. Es una característica frecuente en las neoplasias malignas y las lesiones displásicas. Se clasificó en 2 grados (0=ausente, 1=presente).

16. Pseudoacantólisis o patrón discohesivo.

Se definió como la tendencia a presentar en algunas áreas del tumor zonas en las que se ha perdido la cohesión celular. Las células adquieren una morfología redondeada. Se clasificó en 2 grados (0=ausente, 1=presente).

7.6.1.7 Análisis estadístico

Los datos recogidos se analizaron usando los programas estadísticos SPSS versión 15.0 (SPSS, Chicago Illinois, EE. UU.) y R (versión 3.5.1).

El acuerdo entre los dos grupos fue realizado mediante la medida estadística del coeficiente Kappa (k) que es una herramienta de uso ampliamente extendido para medir el acuerdo interobservador ajustado por el azar en una escala ordinal o nominal.

De acuerdo con Landis y Koch, la interpretación de los resultados del coeficiente K se muestran en la tabla 7. (96)

Tabla 7. Grado del acuerdo según el coeficiente Kappa

COEFICIENTE KAPPA	GRADO DEL ACUERDO
<0,00	Sin acuerdo
0,00-0,20	Insignificante
0,21-0,40	Discreto
0,41-0,60	Moderado
0,61-0,80	Sustancial
0,81-1,00	Casi perfecto

Para cada característica se construyeron tablas de contingencia y se calcularon los valores específicos de los coeficientes ajustados.

Se utilizó el “software” estadístico R (3.5.1) con el paquete irr (0.84) para calcular los coeficientes kappa. Para aquellas variables no ordinales, en las que todos los niveles de desacuerdo entre los observadores se ponderan equitativamente, se utilizó el método “equal” y para las variables ordinales, en las que los desacuerdos son ponderados de acuerdo con el cuadrado de las distancias respecto al acuerdo perfecto, se utilizó el método “squared”. (97–99)

7.6.2 Estudio 2: Caracterización histológica de los melanomas mutados en el promotor de TERT. Caracterización de las combinaciones TERT+ BRAF-/TERT+BRAF+/TERT-BRAF-/TERT-BRAF+)

#### 7.6.2.1 Equipo clínico y procedimiento de revisión

El estudio se llevó a cabo por dos dermatólogos investigadores del Instituto Valenciano de Oncología (IVO) (OS y EN) y una dermatóloga investigadora del Hospital de Manises (VSM). Todos habían participado en el estudio interobservador previo.

Para la evaluación cuantitativa de la morfología celular y de la superficie celular se contó con la participación de una cuarta dermatóloga investigadora del IVO y los datos se volcaron directamente en una hoja Excel (Microsoft versión 16.37).

Para la valoración de los casos se usó un cuadernillo en papel con la definición de variables del estudio, su descripción y su clasificación para poder consultarlo durante la evaluación de los casos (Anexo 6). Durante este procedimiento no se conocían las características clínicas de los casos ni el estado mutacional, se trataron de forma pseudoanónima y únicamente se proporcionaban los cortes histológicos.

Además, se proporcionaron hojas en papel para la recogida de datos codificadas mediante un número (Anexo 7). Posteriormente los datos se exportaron a una tabla Excel (Microsoft versión 16.37).

Cuando alguna característica concreta no podía evaluarse se consideraba como “no evaluable”.

### 7.6.2.5 Datos epidemiológicos y clínico-patológicas generales

Se recogieron las siguientes variables: la edad al diagnóstico (de forma continua y en rangos según 3 grupos <40, 40-65, >65), el sexo (varón/mujer), la localización del tumor primario (cabeza/cuello, extremidades superiores, tronco, extremidades inferiores, acral), el estadio al diagnóstico (localizado, locorregional y metástasis a distancia) y el tipo histológico (LMM, MES, MN, MLA, otros).

### 7.6.2.6 Características histopatológicas

Se valoraron las variables que se muestran a continuación.

1. Extensión pagetoide. 2 grados según la presencia de melanocitos suprabasales (0= menos del 25%, 1=más del 25%)
2. Formación de nidos. 2 grados según la presencia de melanocitos de nidos (0=menos del 25%, 1=más del 25%)
3. Pigmentación de los melanocitos. 2 grados según la cantidad de pigmento (0=ausente o mínima, 1=evidente).
4. Contorno epidérmico. 3 categorías según el grosor epidérmico de la epidermis de la periferia tumoral respecto a la adyacente sana, (0= Atrófico o adelgazado, 1= Normal, 2= Engrosamiento).
5. Patrón de crecimiento. 3 categorías (0= Sin predominio, 1= predominantemente expansivo, 2= predominantemente infiltrativo).
6. Elastosis (2 grados; 0= No CSD, 1= CSD)
7. Elastosis (3 grados; 0=ausencia, 1= No CSD, 2= CSD). Esta variable, a diferencia de la anterior, desglosó la variable No CSD dos grados según si había ausencia elastosis o presencia discreta, sin alcanzar los criterios definitorios de la elastosis en grado CSD.
8. Morfología celular cualitativa. 3 categorías (0= redonda u ovoide, 1= elongada o fusiforme, diámetro largo aproximadamente 1/3 mayor que el corto, 2= no hay predominio).
9. Morfología celular cualitativa. En la parte más celular del tumor a 200x, se midieron 5 diámetros mayores y 5 menores de forma aleatoria y se obtuvieron las medias respectivas. Posteriormente se realizó el cociente de la media de diámetros

## MATERIALES Y MÉTODO

menores entre media de diámetros mayores. Según los resultados del cociente: 0,71-1= redonda u ovoide, 0,1-0,7= fusiforme o alargada

10. Morfología polipoide. 2 categorías (0= ausencia, 1=presencia).

11. Acantólisis. 2 categorías (0= ausencia, 1=presencia).

12. Superficie celular. La medición se realizó en la parte más celular del tumor, tomando las medidas de 5 células de forma aleatoria con el microscopio óptico. Para ello se utilizó la fórmula matemática para el cálculo de la superficie de la elipse (producto de semieje mayor, semieje menor y número  $\pi$ ).

13. Presencia de ulceración. 2 categorías (0= ausencia, 1=presencia).

14. Regresión. 0= ausencia, 1= leve. Presencia <50% del área del tumor, 2= marcada. Presencia >50% del área del tumor.

15. Tipo histológico. 5 categorías (1= LMM, 2= MES, 3=MN, 4=MLA, 5= otros, sin clasificar).

16. Índice de Breslow. Se midió de forma continua y se establecieron 2 categorías (1= menor a igual 2 mm, 2= mayor a 2 mm).

17. Presencia de nevo previo. 2 categorías (0= ausencia, 1=presencia).

18. Infiltrado linfocítico intratumoral. 3 categorías (0=No, 1= non-brisk, 2=brisk)

19. Índice mitótico. Se midió de forma discreta y se establecieron 3 categorías (1=0 mitosis/mm<sup>2</sup>, 2= 1-5 mitosis/mm<sup>2</sup>, 3= más de 5 mitosis/mm<sup>2</sup>).

20. Satelitis microscópica. 2 categorías (1= ausencia, 2=presencia).

21. Invasión vascular. 2 categorías (1= ausencia, 2=presencia).

22. Invasión perineural. 2 categorías (1= ausencia, 2=presencia).

Los resultados de las variables 13 a 22 se tomaron a partir de los datos ya recogidos en la base de datos de MM.

### 7.6.2.7 Análisis genético de BRAF y pTERT

Los procedimientos utilizados para el análisis de las mutaciones, en el pTERT y en BRAF se incluyen en el anexo 1.

### 7.6.2.8 Análisis estadístico

Para el estudio de las diferencias distribución de variables y el análisis univariado se utilizó el programa estadístico SPSS versión 27.0 (SPSS, Chicago Illinois, EE. UU.).

Las diferencias en la distribución de las variables cualitativas se evaluaron usando la prueba Ji cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher (cuando la frecuencia esperada era menor del 5%).

Se comprobó que las variables cuantitativas continuas forma celular (cociente de diámetro menor y mayor) y superficie celular (producto radio mayor, menor y  $\pi$ ) seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro Wilk (anexo 8). Posteriormente se aplicó el estadístico T de Student para comparar las medias de los resultados de ambos grupos (según la presencia o ausencia de mutación en pTERT).

Se realizó una regresión logística univariada binaria para calcular los odds ratios y definir el intervalo de confianza del 95% de la asociación entre el estado mutacional y el resto de las variables histológicas.

Para el estudio multivariante en primer lugar se analizaron las variables del estudio y se eliminaron los casos que contenían exceso de valores faltantes. Se utilizó el software estadístico R versión 4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

A fin de obtener un archivo de datos completos y consistentes para poder ser analizados y tratar valores faltantes, se realizó una imputación múltiple que se llevó a cabo con la librería mice v 3.13.0.

Para establecer la idoneidad de las imputaciones se realizó un PCA (Análisis de componentes principales) mediante la librería ropls v 1.24.0.

Finalmente se llevó a cabo un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) que es una técnica multivariante de análisis supervisado.

A fin de obtener el número de componentes mínimos cuadrados parciales (PLS) para minimizar la tasa de error se llevó a cabo la técnica hold-out repetida sobre el 70% de los datos para entrenamiento y el 30 % para validación. Utilizando la librería ropls v 1.24.0. se creó el primer modelo y se validó por individuos y por variables.

Para la validación de individuos se usó tanto la suma de cuadrados residual (SCR) como la medida T2 de hotelling y para la validación de variables se utilizaron los p valores de los coeficientes de regresión y los VIPs (variable importance in the projection).

Se llevó a cabo un cribado sucesivo hasta alcanzar el modelo PLSDA final con su validación correspondiente.

## MATERIALES Y MÉTODO

## CAPÍTULO 8

# ***08.Resultados***

---

Estudio 1: Establecimiento de las variables del estudio mediante un estudio de concordancia interobservador

8.1.1 Descripción de la población

Para este primer estudio se seleccionaron los primeros 60 casos consecutivos diagnosticados en el servicio de Dermatología del IVO desde enero de 2004 hasta enero de 2017.

Se excluyeron 5 casos, 4 de ellos por ser no interpretables debido a su pequeño tamaño y 1 por duplicidad (2 cortes de un mismo caso). Finalmente, se analizaron 55 casos (Fig. 5).

Se realizaron dos rondas de evaluación histológica.

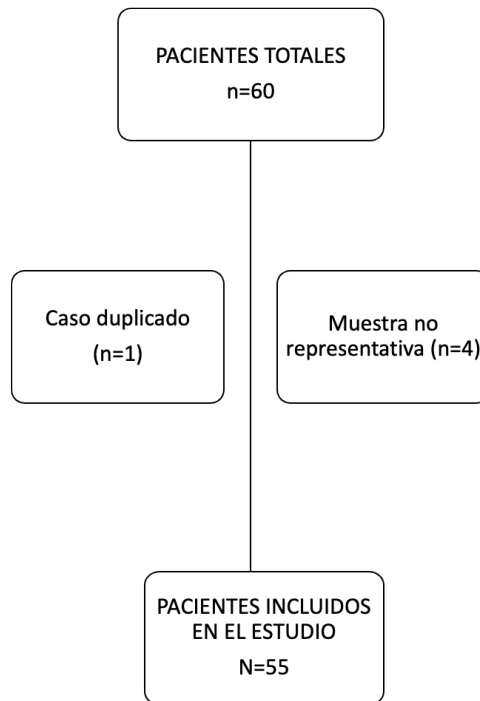


Figura 11 Diagrama de flujo del proceso de selección de casos para el estudio 1

La población del estudio incluyó 55 pacientes, 28 (50,9%) varones y 27 (49,1%) mujeres, con una edad media en el momento del diagnóstico de 58,9 años (rango 23-82 años). Los datos correspondientes a la localización del tumor primario, al tipo histológico, al estadio tumoral, así como al perfil mutacional se recogen en la tabla 8.

## RESULTADOS

Tabla 8 Características epidemiológicas, clínico-patológicas y mutacionales de los pacientes incluidos en el estudio 1.

VARIABLE	Número (%)
<b>SEXO (Número/% total)</b>	
Varón	28 (50,9%)
Mujer	27 (49,1%)
<b>EDAD</b>	
Media	58,9
Rango	(23-82)
Por intervalos (Número/% total)	
<40	
40-65	5 (9,1%)
>65	27 (49,1%)
	23 (41,8%)
<b>LOCALIZACIÓN (Número/% total)</b>	
Cabeza/cuello	8 (14,6%)
Extremidades superiores	9 (16,4%)
Tronco	15 (27,3%)
Extremidades inferiores	14 (25,5%)
ACRAL	9 (16,4%)
<b>TIPO HISTOLÓGICO (Número/% total)</b>	
LMM	3 (5,5%)
MES	28 (50,9%)
MN	
MLA	19 (34,6%)
Otros	4 (7,3%)
	1 (1,8%)
<b>ESTADIO TUMORAL (Número/% total)</b>	
Localizado	36 (65,5%)
Locorregional	19 (34,5%)
Metástasis a distancia	0 (0%)

### 8.1.2 Resultados del estudio de concordancia interobservador

#### Primera ronda

La concordancia media fue moderada ( $k=0,48$ ).

Los valores más altos de concordancia se obtuvieron para la morfología polipoide ( $k=0,82$ ) pigmentación ( $k=0,75$ ), elastosis solar de 4 categorías ( $k=0,72$ ), ulceración ( $k=0,68$ ), y elastosis de 2 categorías ( $k=0,67$ ).

Los valores más bajos se correspondieron con el pleomorfismo ( $k=0,16$ ), la necrosis ( $k=0,25$ ), la morfología celular ( $k=0,32$ ) y la delimitación lateral ( $k=0,32$ ).

En la tabla 8 se exponen los resultados de los coeficientes  $k$  para cada variable (segunda columna).

Tras la primera ronda se simplificaron múltiples variables y quedaron reclasificadas de la siguiente manera:

#### Extensión pagetoide, 2 categorías:

0: Prácticamente todos los melanocitos en la unión dermoepidérmica. La mayoría de los melanocitos (75-100%) están en la unión dermoepidérmica y menos del 25% en estratos más altos en la epidermis.

1: Franca extensión pagetoide: >25% de melanocitos en estratos suprabasales.

#### Formación de nidos, 2 categorías:

0: Melanocitos aislados o raramente formando pequeños nidos. Menos de 25% de nidos intraepidérmicos

1: >25% de los melanocitos en nidos

#### Pigmentación de los melanocitos, 3 categorías:

0: Ausente o débil. Apenas visible pequeño aumento. A gran aumento, melanocitos con pigmento difuso débil o pocos gránulos de pigmento.

1: Moderada. Pigmentación visible a pequeño aumento con citoplasma más claro que el núcleo teñido de hematoxilina.

2: Intensa o muy intensa. Fácilmente visible a bajo aumento con una intensidad de pigmento citoplásmico parecida o superior a la del núcleo.

Para el análisis estadístico de la segunda ronda se transformó en una nueva variable denominada “presencia de pigmentación intensa” con 2 categorías (“sí/no”), agrupándose las categorías 0 y 1 en una sola (0”no”) y la categoría 2 en la nueva categoría 1 (“sí”)

## RESULTADOS

Contorno epidérmico, 3 categorías:

0: Atrofia o adelgazado: epidermis claramente adelgazada con aplanamiento de las crestas epidérmicas, epidermis adelgazada, pero con atenuación parcial de las crestas epidérmicas

1: Normal, parecida a la epidermis adyacente

2: Engrosamiento, epidermis engrosada con alargamiento de las crestas epidérmicas hasta x2 el grosor de la epidermis adyacente. Hiperplasia, epidermis engrosada más de x2 el grosor de la epidermis adyacente

Morfología celular cualitativa, 3 categorías:

0: Redonda u ovoide: redondeada, diámetro largo y corto similar/ovoide, diámetro largo aproximadamente 1/3 mayor que el corto.

1: Elongada o fusiforme: elongada, diámetro largo de 1/3 a x2 veces mayor que el corto/fusiforme, diámetro largo x2 veces mayor que el corto

2: no hay predominio de ningún subtipo, al menos 2 subtipos distribuidos aproximadamente al 50%

Además, se eliminaron del estudio la variable pleomorfismo por su baja reproducibilidad y prevalencia y la variable delimitación lateral también por su baja reproducibilidad y su escasa relevancia clínica.

Segunda ronda

Se analizaron los mismos casos que en la primera ronda.

No se analizaron ni la elastosis solar ni la morfología polipoide por la alta reproducibilidad obtenida en la primera ronda.

Se obtuvo una concordancia media moderada ( $k=0,49$ ). Los valores más altos de acuerdo se obtuvieron para la extensión pagetoide ( $k=0,73$ ), la pigmentación ( $k=0,64$ ), la presencia de ulceración ( $k=0,64$ ) y el patrón de crecimiento ( $k=0,62$ ). La concordancia fue débil para; la morfología celular ( $k=0,33$ ), la presencia de pseudoacantólisis ( $k=0,34$ ), el tipo de ulceración ( $k=0,36$ ) y la necrosis ( $k=0,37$ ). Tras la segunda ronda y debido a su baja reproducibilidad se eliminaron para el estudio 2 las variables tipo de ulceración y necrosis. La variable contorno epidérmico también se eliminó porque, aunque la reproducibilidad fue moderada se consideró que tenía poca relevancia clínica,

Dada la buena reproducibilidad de la elastosis tanto la medida en 4 categorías como la de 2, no se valoró en la 2ª ronda. Además, para el estudio 2 se excluyó la que recogía la categorización en 4 grados pues determinamos que la de 2 grados era igualmente reproducible, válida y relevante. Posteriormente y para el estudio se analizó una variante de esta y se tuvieron en cuenta los casos no CSD pues nos interesaba conocer cómo se clasificaba la categoría no CSD respecto a la ausencia o presencia de elastosis leve.

## CAPÍTULO 8

En la tabla 9 se exponen los resultados de los coeficientes k para cada variable (tercera columna).

Tabla 10. Resultados de los coeficientes kappa (nivel de acuerdo) de las tres rondas de evaluación

	55 CASOS (1ª RONDA)	55 CASOS (2ª RONDA)
Extensión pagetoide	0,45	0,73
Formación de nidos	0,47	0,41
Pigmentación	0,75	0,64
Distribución del pigmento	ND	0,52
Patrón de crecimiento	0,35	0,62
Contorno epidérmico	0,39	0,41
Delimitación lateral	0,32	ND
Elastosis solar	0,72	ND
Tipo de elastosis	0,67	ND
Morfología celular	0,32	0,30
Ulceración	0,68	0,65
Tipo de ulceración	0,43	0,36
Morfología polipoide	0,81	NA
Regresión	0,51	0,52
Necrosis	0,25	0,37
Patrón discohesivo	0,42	0,34
Pleomorfismo	0,16	ND

## RESULTADOS

8.2 Estudio 2: Caracterización histológica de los melanomas mutados en el promotor de TERT. Caracterización histológica de las combinaciones TERT+ BRAF-/TERT+BRAF+/TERT-BRAF-/TERT-BRAF+.

### 8.2.1 Descripción de la población

Se incluyeron 346 casos consecutivos de MM invasivo registrados en el periodo desde enero de 2004 a enero de 2017 del servicio de dermatología del IVO.

De los 346 casos incluidos en el estudio y tras comprobar que no disponíamos de cortes adicionales, se excluyeron 4 casos por ser no valorables, bien por el deterioro de la muestra (rotura del cristal) (1 caso), bien por problemas en el procesamiento (3 casos), que hicieron imposible la interpretación de los casos (Fig. 6).

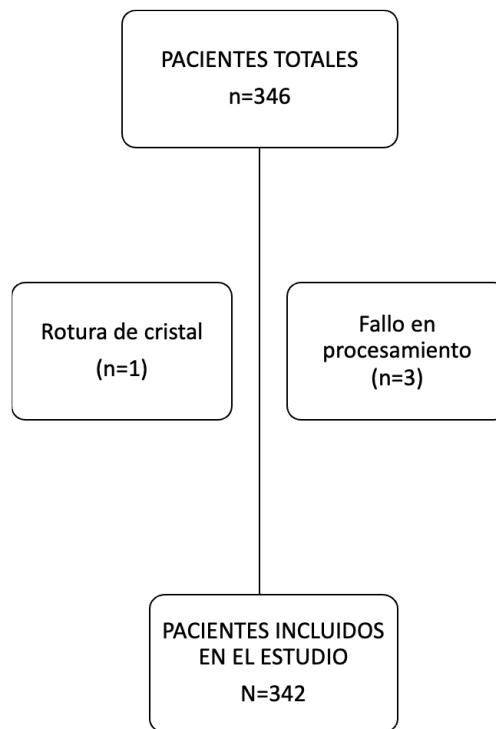


Figura 12 Diagrama de flujo de estudio 2

La población del estudio incluyó a 179 (52,3%) varones y 163 (47,7%) mujeres con una edad mediana en el momento de diagnóstico de 58 años (rango, 18-90 años).

Respecto a la localización de la lesión primaria, la más frecuente fue el tronco (42,1%), el tipo histológico más frecuente fue el MES (55,6%) y, por último, el estadio tumoral localizado el más frecuente (74%).

## CAPÍTULO 8

Los resultados restantes correspondientes a los datos epidemiológicos y clínico-patológicos se pueden ver en la tabla 10.

Tabla 11. Características epidemiológicas y clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio 2.

VARIABLE	Número	%
SEXO		
Varón	179	52,3
Mujer	163	47,7
EDAD		
<40 años	47	13,7
40-65 años	169	49,4
>65 años	126	36,8
LOCALIZACIÓN		
Cabeza/cuello	44	12,9
Extremidades superiores	43	12,6
Tronco	144	42,1
Extremidades inferiores	67	19,6
ACRAL	44	12,9
TIPO HISTOLÓGICO (Número/% total)		
LMM	18	5,3
MES	190	55,6
MN	97	28,4
MN	27	7,9
MLA	10	2,9
Otros		
ESTADIO TUMORAL (Número/% total)		
Localizado (I-II)	253	74
Locorregional (III)	86	25,1
Metástasis a distancia (IV)	3	0,9

En cuanto al perfil mutacional, el 100% de los casos se estudiaron para la mutación pTERT y el 95,3 % para la mutación BRAF.

148 (43,3%) de los 342 casos valorados tenían una mutación en pTERT y 124 (38%) de los 326 casos con estudio de BRAF tenían alguna mutación patogénica. (Tabla 11).

## RESULTADOS

Tabla 11. Perfil mutacional de los pacientes incluidos en el estudio 2.

VARIABLE	Número	%
REALIZACIÓN DE BRAF	326	95,3
Realizado	16	4,7
No realizado		
ESTADO BRAF	202	62
Nativo	124	38
Mutante		
REALIZACIÓN DE PTERT	342	100
Realizado	0	0
No realizado		
ESTADO DEL PTERT	194	56,7
Nativo	148	43,3
Mutante		

Se realizó un análisis de las diferencias en la distribución de las variables según el perfil mutacional en pTERT, además de una regresión logística univariada y un análisis multivariado.

Con el fin de analizar el comportamiento de las distintas combinaciones posibles de BRAF y pTERT, se hizo un análisis de distribución de variables según los subgrupos de mutaciones, una regresión logística univariada multinomial y un análisis multivariado.

### 8.2.2 Análisis de distribución de variables y estudio univariado pTERT+ versus pTERT-

Las tablas con todos los resultados del estudio 2 se encuentran en el anexo 9

Los MM pTERT+ mostraron una menor presencia de nidos intraepidérmicos respecto a los pTERT- (51% en los mutados y 67,6% en los no mutados; OR=0,5; IC=0,3-0,8; p=0,004). (Fig. 13).

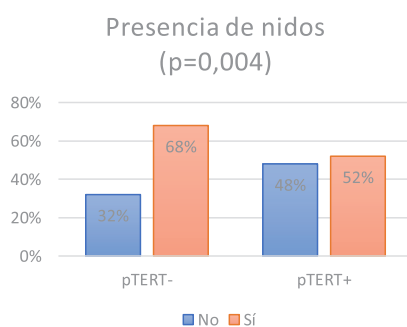


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Los MM pTERT+ presentaron más frecuentemente ausencia pigmentación intensa que los pTERT- (49% versus 37%, respectivamente). En la regresión logística univariada se objetivó una asociación negativa significativa entre la presencia de pigmentación intensa y la mutación en pTERT (OR=0,5; IC=0,3-0,8; p=0,004). (Fig. 14).

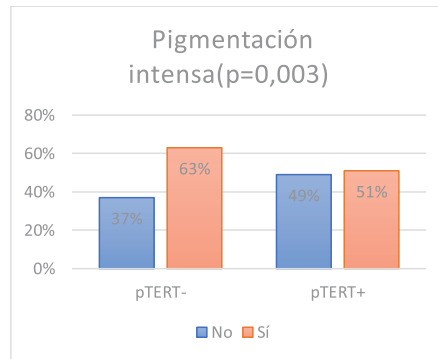


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Los MM pTERT+ presentaban más frecuentemente un patrón de crecimiento expansivo (40,8%) que los MM pTERT- (27%) (p=0,014). (Fig. 9). Por tanto, el patrón infiltrativo fue más frecuente en los melanomas pTERT- (72,6%) que en los pTERT+ (59,2%) (patrón infiltrativo y mutación en pTERT: OR=0,6; IC=0,3-0,9; p=0,020).

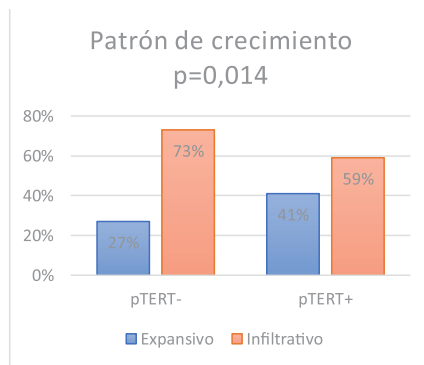


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

La ulceración fue más frecuente en el grupo de los MM pTERT+ (33,8%) que en los pTERT- (18,1%) (OR=2,3; IC=1,4-3,9; p=0,001) (Fig. 16).

## RESULTADOS

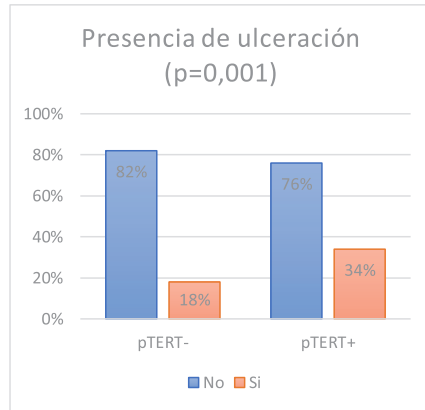


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Respecto a la elastosis se objetivó que los MM pTERT+ presentaron más frecuentemente elastosis en grado CSD (12,2%) respecto a los pTERT- (4,3%) (OR=3,6; IC=1,5-8,7; p=0,004) (Fig. 17).

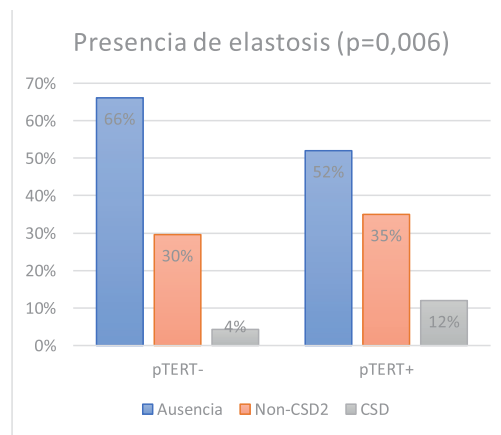


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

La presencia de acantólisis fue más habitual en los MM pTERT+ (21,8%) que en los pTERT- (13,7%) (OR=1,8; IC=1,0-3,1; p=0,05) (fig. 18).

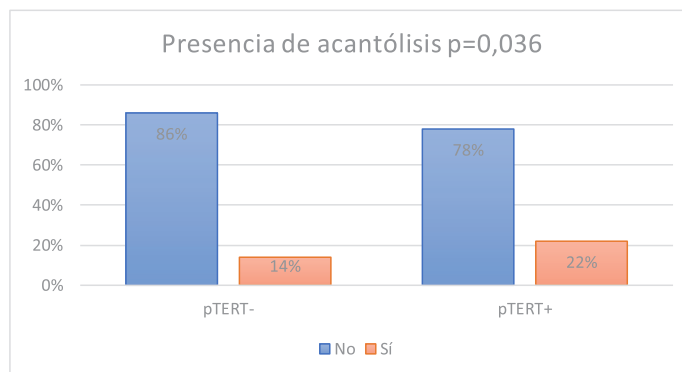


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

La morfología polipoide fue más frecuente en los MM pTERT+ (16,1%) que en los MM pTERT- (5,3%) (OR=1,8; IC=1,6-7,5; p=0,002) (fig. 19).

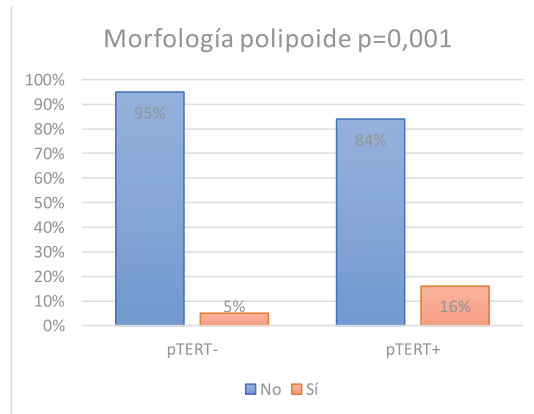


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

En relación con el índice de Breslow, los MM pTERT+ mostraron con mayor frecuencia un índice de Breslow mayor a 2 mm (54,7%; OR=2,6; IC=1,7-4,1; p<0,001) que los MM pTERT- (31,4%).

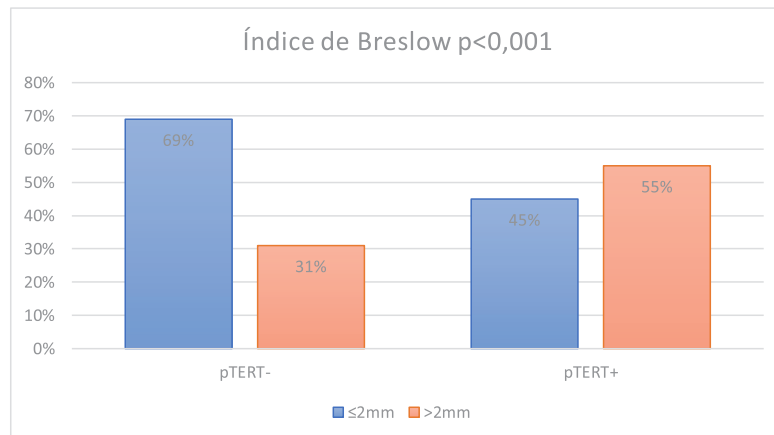


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Los MM pTERT+ mostraron en mayor proporción un índice mitótico mayor a 5 mitosis/mm<sup>2</sup>, (29,9%) (OR=9; IC=4,1-19,9; p=0,000) que los MM pTERT- (7%) (Fig. 21).

## RESULTADOS

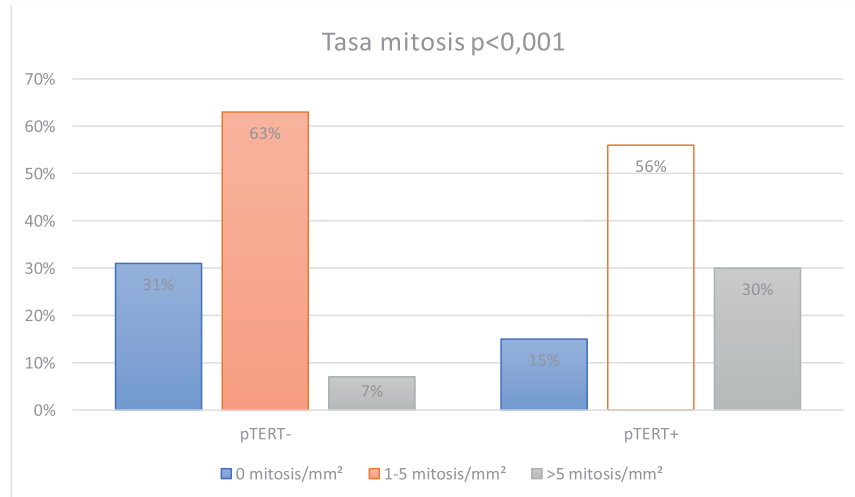


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Los MM pTERT+ mostraron con menor frecuencia el grosor epidérmico normal que los MM pTERT- (27,4% versus 43,7% respectivamente; OR= 0,3; IC= 0,1-1,0; p=0,047).

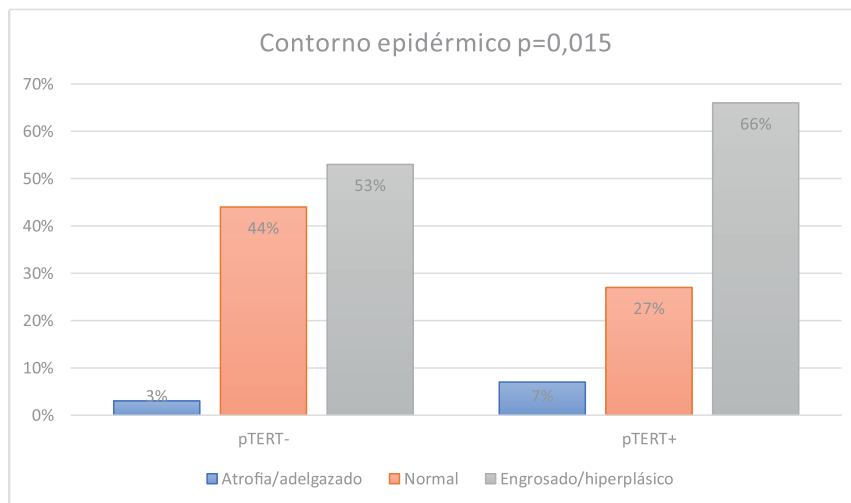


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

La invasión vascular fue más frecuente en los MM pTERT+ (4,1%) que en los (1,0%) con un valor próximo a la significación estadística en el análisis univariado (p=0,064) (OR=4,1; IC=0,2-9,4; p=0,086).

Los MM pTERT+ presentaban células de mayor tamaño, con una superficie celular mayor que los MM pTERT- (319,15  $\mu\text{m}^2$  y 296,37  $\mu\text{m}^2$  respectivamente; p=0,043).

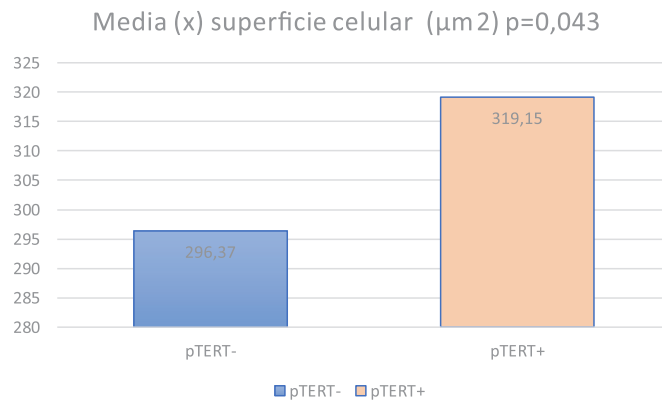


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

8.2.3 Análisis de distribución de variables y estudio univariado multinomial BRAF+/pTERT+ versus BRAF-/pTERT+ versus BRAF+/pTERT- versus BRAF-/pTERT-

Respecto a la pigmentación, en el análisis de distribución de variables por subgrupos observamos una tendencia muy próxima a la significación estadística, en la que el grupo BRAF-/pTERT+ mostró ausencia de pigmentación intensa en mayor proporción (48,6%) respecto a los otros grupos, BRAF+/pTERT+ (29,8%), BRAF-/pTERT- (22,2%) y BRAF+/pTERT- (18,3%) (p=0,008). (Figura 24).

En la regresión logística multinomial se observó una asociación positiva significativa entre la combinación BRAF-/pTERT+ y ausencia de pigmentación intensa en relación con el grupo BRAF-/pTERT- (OR=2,6, IC=1,4-4,9; p=0,004).

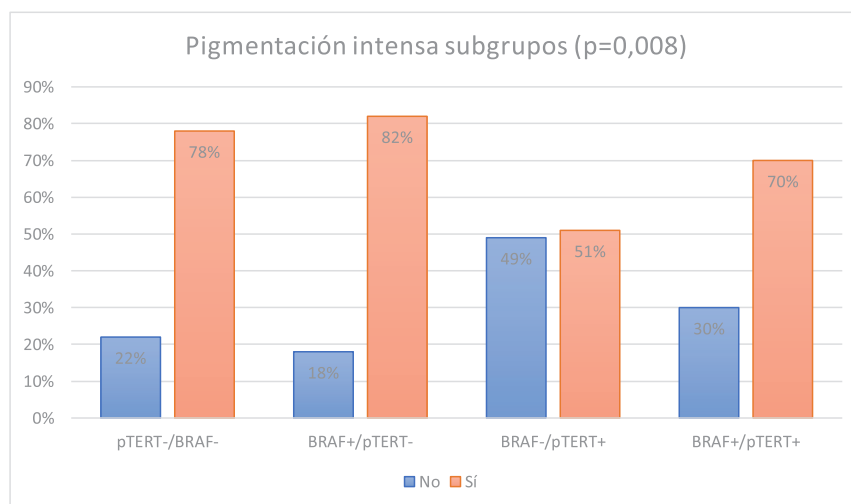


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

## RESULTADOS

El patrón expansivo fue más frecuente en el subgrupo BRAF-/pTERT+ (53,6% p=0,003) (OR=3,4; IC:1,7-7, p=0,004) que en el resto de los subgrupos (BRAF+/pTERT+=29,9%, BRAF+/pTERT-=29,3%, y BRAF-/pTERT-= 25%; p=0,003) (Figura 25).

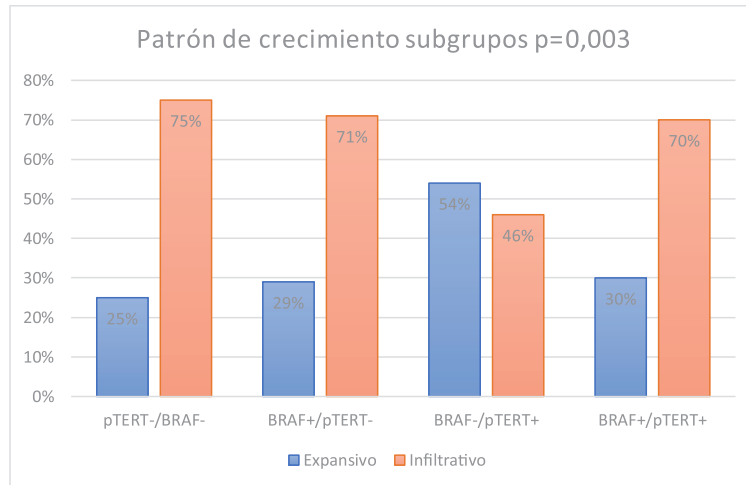


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

El grupo con mayor prevalencia de ulceración en nuestro estudio fue el de la doble mutación BRAF+/pTERT+ (33%) respecto al resto de grupos [BRAF-/pTERT+ (21,4%), BRAF+/pTERT- (19,1%) y BRAF-/pTERT- (17,9%) (p<0,001) (Figura 26)]. En el estudio univariado se observó una asociación positiva entre el grupo BRAF+/pTERT+ y la presencia de ulceración (OR=3,8; IC=2,0-3,7; p<0,001).

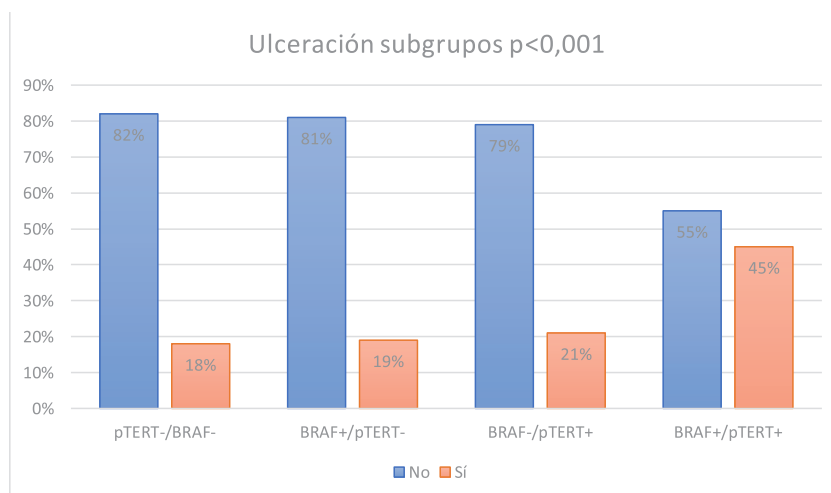


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Los MM BRAF-/pTERT+ fueron los que mayor porcentaje de elastosis tipo CSD presentaron (22,9%) (OR=9,2; IC=3,1-27,2; p<0,001) frente el resto de las combinaciones: BRAF+/pTERT- (4,9%), BRAF+/pTERT+ (4,3%) y BRAF-/pTERT- (2,5%) (Figura 27).

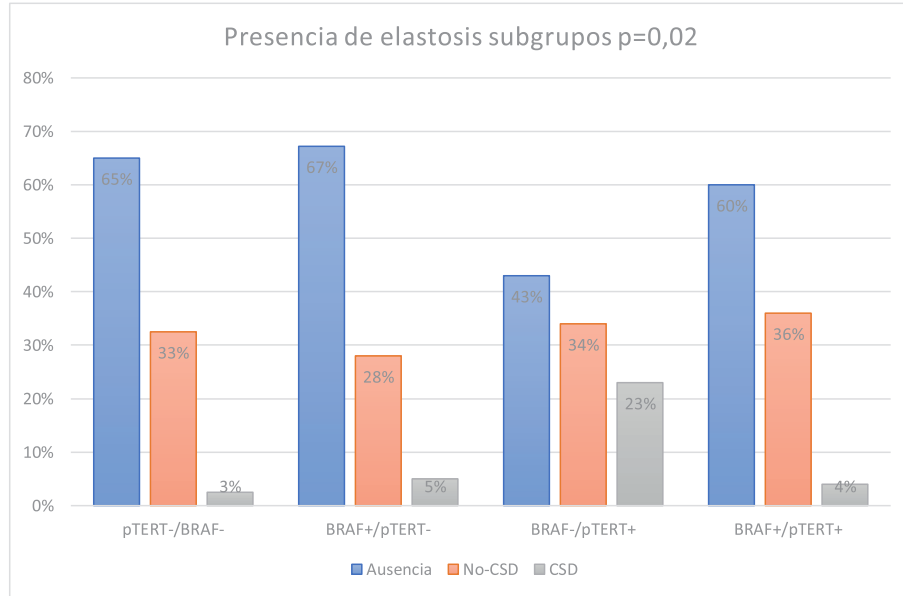


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Los MMs BRAF+/pTERT+ fueron los que presentaron una mayor prevalencia de la morfología polipoide (23,6%) (OR=9,5; IC=3,1-29,6; p<0,001), seguidos de BRAF+/pTERT- (12,5%) (OR=4,4; IC=1,2-16,6; p=0,027), BRAF-/pTERT+ (8,75%) y, por último, el grupo de MM BRAF-/pTERT- (3,1%).

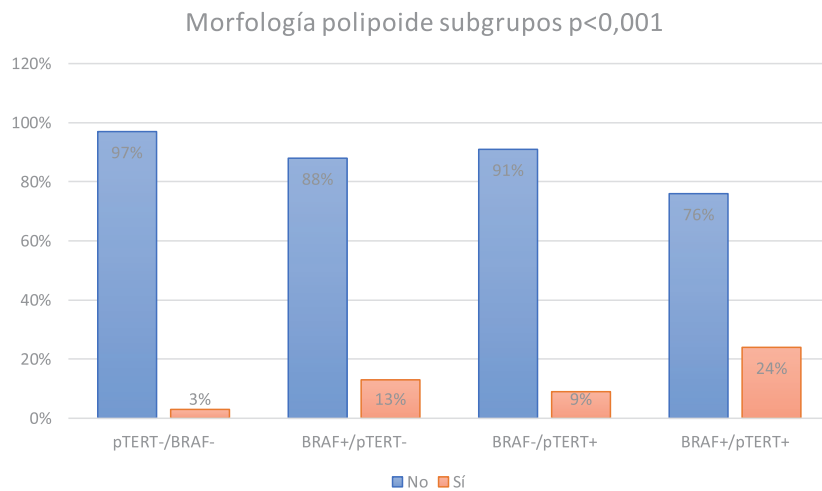


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

## RESULTADOS

El grupo BRAF+/pTERT+ fue el que presentó una significativa mayor prevalencia de Breslow mayor a 2 mm (56,8%) (OR=3,2; IC=1,8-5,8; p<0,001) seguido de cerca de la combinación BRAF-/pTERT+ (51,4%) (OR=2,6; IC=1,4-4,7; p=0,002), respecto a los MMs BRAF+/pTERT- (34%) y BRAF-/pTERT- (29,2%).

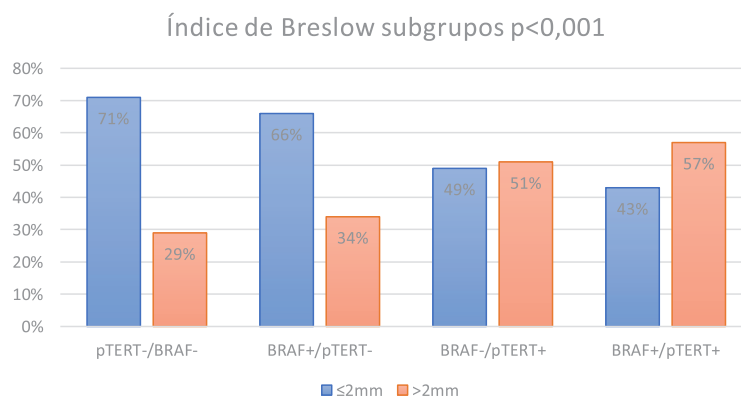


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

En el análisis por subgrupos se observó que era el grupo BRAF+/pTERT+ el que más frecuentemente mostró un índice mitótico superior a 5 mitosis/mm<sup>2</sup> (35,6%) (OR=36,6; IC=10,0-133,3; p<0,001) seguido por el grupo BRAF-/pTERT+ (24,3%) (OR=5,6; IC=2,1-15,4; p=0,001) la combinación BRAF+/pTERT- (8,2%) y, por último, el grupo BRAF-/pTERT- (6,4%).

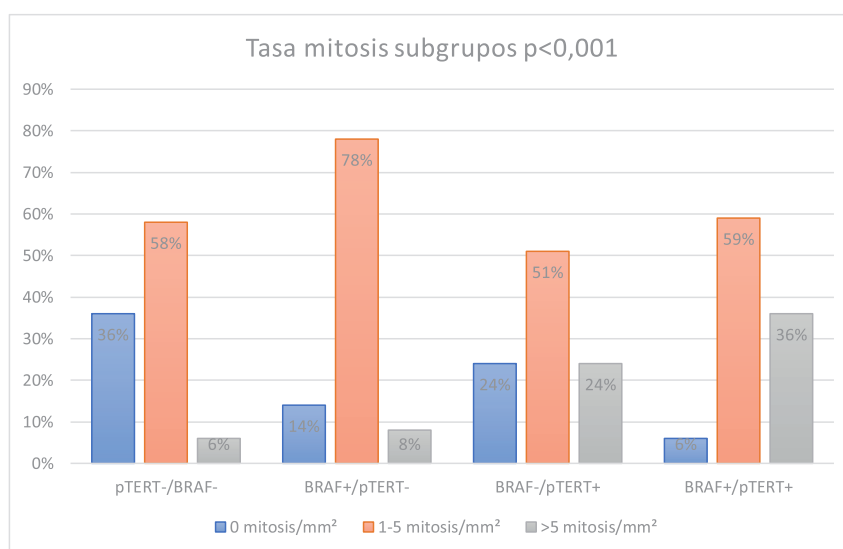


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Observamos una asociación significativa positiva entre el grupo de MM BRAF+/pTERT+ y la presencia de acantólisis (OR=2,3; IC=1,1-4,7; p=0,024).

Respecto a la tendencia a formar nidos, los MM BRAF-/pTERT+ se asociaron a menor presencia de nidos (OR=0.4; IC 0,2-0,7; p=0,002).

El grupo de los MM mutados en BRAF+/pTERT+ fue el que presentó una mayor superficie celular media (346,98  $\mu\text{m}^2$ ), seguido de los MM BRAF+/pTERT- (304,52  $\mu\text{m}^2$ ), de los MM BRAF-/pTERT- (296,82  $\mu\text{m}^2$ ) y por último de los BRAF-/pTERT+ (292,42  $\mu\text{m}^2$ ) (p=0,045).

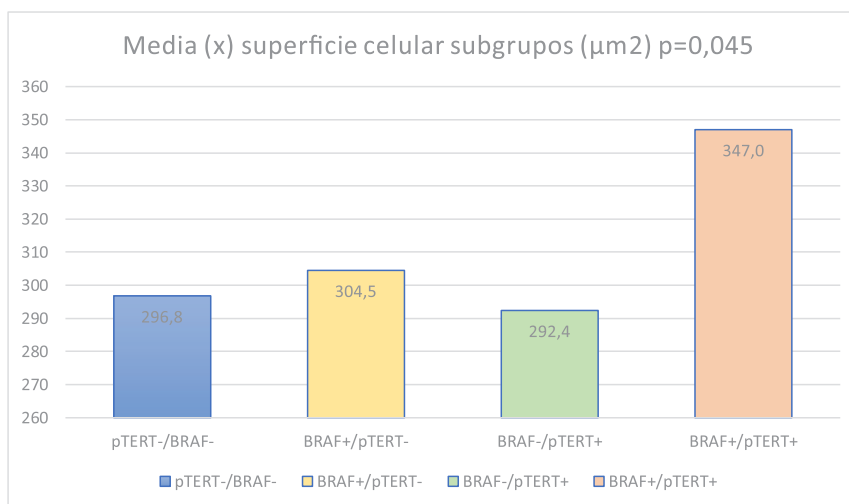


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Para las siguientes variables no hallamos resultados ni asociaciones estadísticamente significativas: extensión pagetoide, morfología celular cualitativa, morfología celular cuantitativa, regresión, tipo histológico, presencia de nevo previo, presencia de infiltrado linfocitario intratumoral, presencia de satelitosis microscópica ni de invasión perineural (anexo 11).

## 8.2.4 Análisis multivariado

### 8.2.4.1 Imputación de la base de datos.

En primer lugar, se realizaron algunos ajustes de las categorías de las variables. Esto fue debido a que algunas categorías contenían muy pocos casos que dificultaban el análisis estadístico y tras observar que las categorías se podían agrupar en el análisis de componentes principales se procedió al ajuste. Así la variable tipo histológico se transformó en 4 categorías en vez de 5 eliminando la opción “otros, sin clasificar” y la variable infiltrado linfocitario intratumoral se reclasificó de 3 categorías a 2 como “ausente/presente” al igual que la variable regresión que se reagrupó de 3 a 2 categorías como “ausente/presente”.

Además, el espesor de Breslow y la tasa de mitosis se incluyeron en modo numérico y, por último, para la valoración de la elastosis se consideró la elastosis medida en 3 categorías (Ausencia/No CSD/CSD) y la de 2 categorías (No CSD/CSD), por considerarla más informativa.

## RESULTADOS

Se eliminaron 8 casos por contener más de un 25% de valores faltantes. Así pues, la muestra final a imputar contenía 324 pacientes. A fin de asegurar que estos casos eran aleatorios y que su imputación era segura se realizó un análisis de coocurrencia. (figura 32).

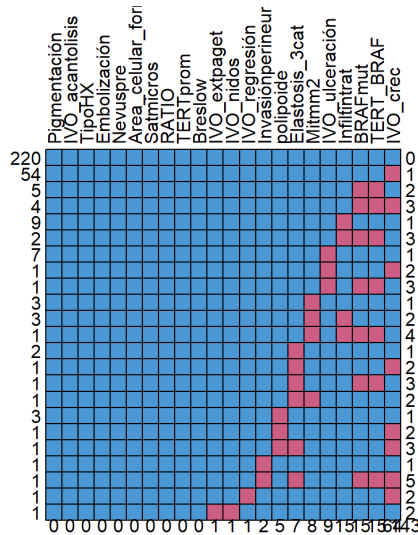
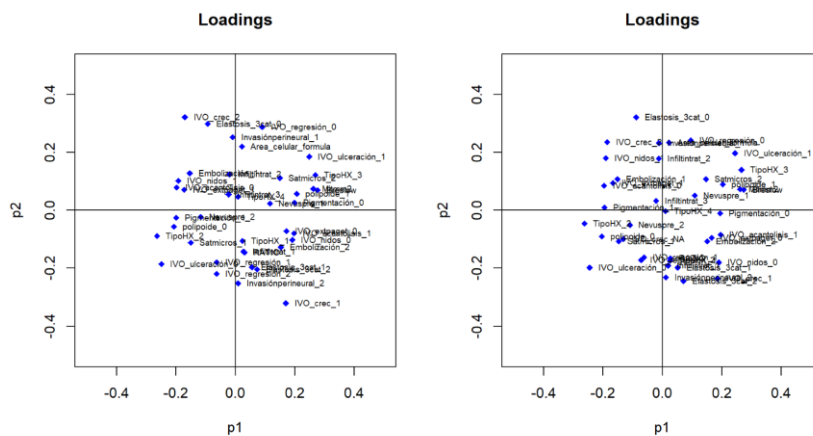


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Las variables que presentaron patrones de coocurrencia fueron las asociadas a la presencia de mutaciones, pero no supuso un conflicto pues no debían incluirse en la imputación. Sin embargo, la variable patrón de crecimiento presentaba un alto porcentaje de valores perdidos (19,7%) y quedaba próxima al 20% que es el límite aceptado para poder imputar una variable. Se comprobó la idoneidad de la imputación de dicha variable mediante un análisis de componente principales (ACP).

Tras analizar los “loadings” de los dos modelos, no se observó que las estructuras de relación encontradas en la base de datos se vieran afectadas por la imputación. (Figura 33).



Asimismo, tampoco se objetivaron grandes diferencias en los gráficos de la cantidad de variabilidad explicada por cada componente (bondad de ajuste o R<sup>2</sup>) (Fig. 28).

Estos 2 hallazgos permitieron afirmar que no había peligro en la imputación de la variable patrón de crecimiento, a pesar de su elevado porcentaje de valores faltantes.

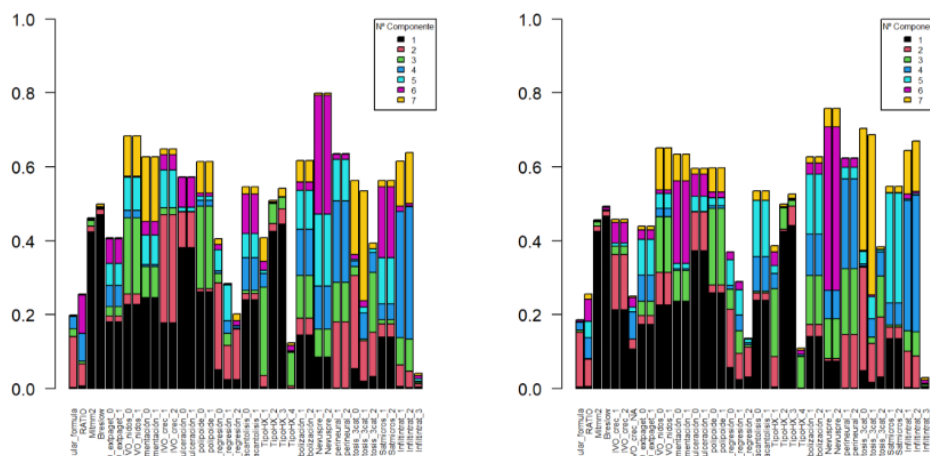


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

#### 8.2.4.2 PLSDA de la mutación pTERT y variables histológicas

Se realizó un “hold-out” repetido a fin de analizar la tasa error para el distinto número de componentes de mínimos cuadrados parciales o “partial least squares” (PLS) y se escogió el modelo de 2 componentes pues no se encontraron diferencias significativas entre los números de componentes a extraer. Se obtuvo un primer modelo, se cribó y se realizó la validación por individuos y por variables. Hubo un individuo de la muestra que rompió la estructura de relación del modelo y se excluyó del análisis. Se procedió de nuevo a la validación por individuos y variables. El modelo final permitió visualizar un comportamiento diferente entre los 2 grupos de mutación (tasa de error= 31,58%) (Fig.29).

## RESULTADOS

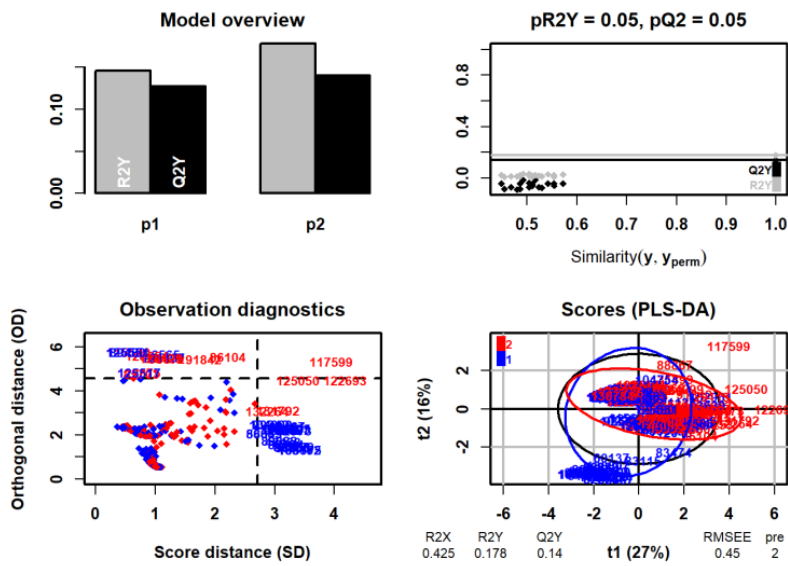


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

Se analizaron las relaciones encontradas por el modelo y se presentaron a través del gráfico con los pesos o “weights” (Fig. 30), hallándose una posible relación de la mutación pTERT con una elastosis en grado CSD, un índice mitótico alto y con los tipos histológicos diferentes al MLA.

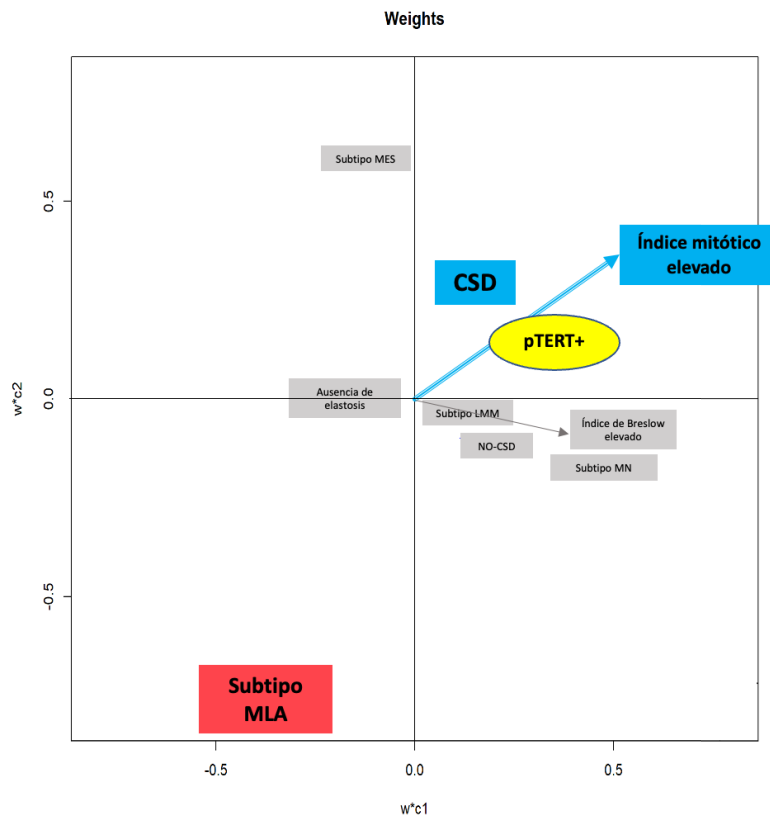


Figura 13 Análisis de distribución de las variables formación de nidos y presencia de la mutación pTERT.

8.2.4.3 PLSDA de la combinación de las mutaciones pTERT y BRAF y variables histológicas

En primer lugar, se eliminaron los 15 pacientes de la muestra que no tenían valores para la variable BRAF, por lo que la muestra final fue de 309 pacientes.

Se realizó la elección de componentes a utilizar por el modelo mediante un hold-out repetido. Mediante una prueba de análisis de la varianza (ANOVA) se observó una clara diferencia en la tasa de error entre los modelos con 2-3 componentes y los modelos con 4-7 componentes por lo que se optó finalmente por seleccionar el modelo con 2 componentes pues mediante un t-test no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el de 2 y 3 componentes.

Se creó un primer modelo, pero debido a una tasa de error alta (50%) se cribó y se validó por individuos y por variables. El modelo final (Fig. 31) mejoró el poder predictivo y permitió reducir la tasa de error respecto al modelo previo (32,93%)

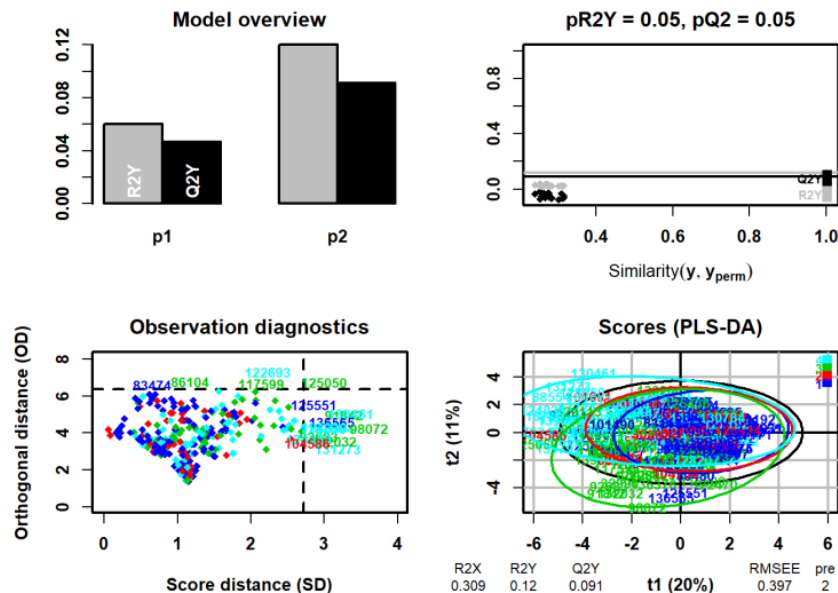


Figura 37 Gráficos representativos del modelo de regresión (Asociación de variables a la presencia de las distintas combinaciones de mutaciones pTERT y BRAF). En azul añil o 1: BRAF-/pTERT-, en rojo o 2: BRAF+/pTERT-, en verde o 3: BRAF-/pTERT+ y en turquesa o 4: BRAF+/pTERT+.

Se analizaron las relaciones encontradas por el modelo y se presentaron a través del gráfico con los pesos o “weights” (Fig. 32). De esta manera, los MM BRAF-/pTERT+ tenían ausencia de pigmentación, un patrón de crecimiento expansivo y la presencia de elastosis CSD, mientras que los MM BRAF+/pTERT+ eran característicamente nodulares, con una morfología polipoide, ulcerados y con un Breslow y un índice mitótico elevados, además mostraron una relación ligera con el patrón de crecimiento infiltrativo y con una ausencia de elastosis.

## RESULTADOS

Los MM BRAF-/pTERT- mostraron un índice mitótico y un Breslow bajo y una asociación ligera a tipos histológicos diferentes al MN.

Del grupo BRAF+/pTERT- no se obtuvieron resultados.

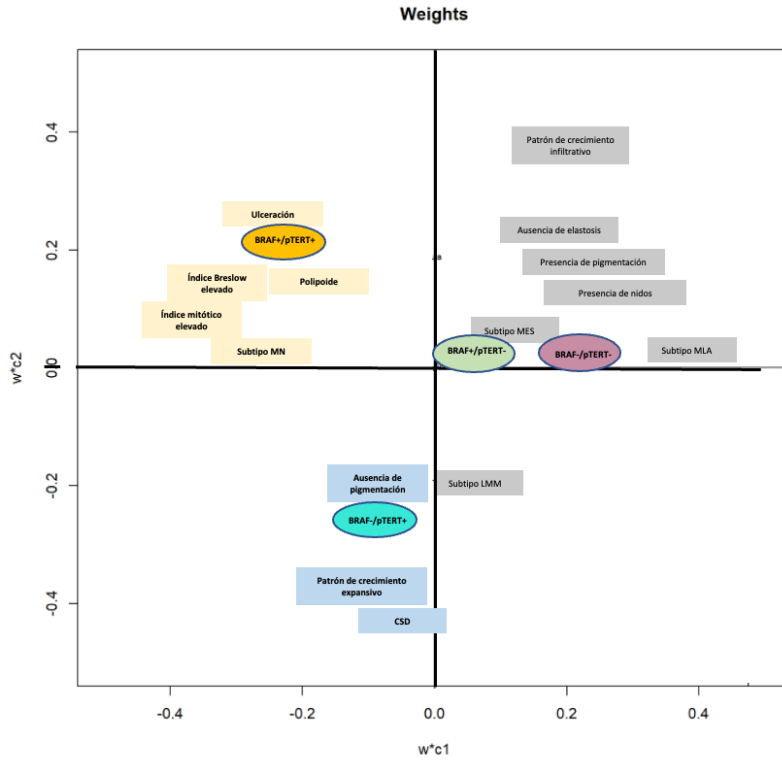


Figura 38 Análisis multivariado. Modelo final del PLS-DA con el gráfico de pesos o “weights” que muestra la relación de las variables del estudio con la presencia de la mutación en pTERT. En azul las variables que se relacionan con la mutación en pTERT y en rojo las variables que por el contrario no mostraron una relación con pTERT. En gris las variables que no mostraron relación significativa con la mutación pTERT en el estudio multivariado.



# *09. Discusión*

Nuestra investigación nos ha permitido detectar algunas características histopatológicas que podrían asociarse a la mutación en el promotor de TERT en el MM. También hemos observado cómo la prevalencia de estos hallazgos se podría ver influenciada en ocasiones por la presencia o la ausencia de una mutación concomitante en BRAF.

Para ello realizamos en primer lugar el estudio 1 titulado: “Variabilidad interobservador en el análisis histológico del melanoma: Análisis de 55 casos” que consistía en un estudio de concordancia interobservador basado en 2 fases o rondas de revisión para lograr un consenso y establecer varias de las variables histopatológicas que usaríamos en el estudio 2 titulado: “Caracterización de los melanomas con mutación en pTERT” y que define el objetivo principal de esta tesis doctoral.

El análisis de las características histológicas es complicado, como lo demuestra la primera parte del estudio. A lo largo de la literatura se han publicado varios trabajos en los que se ha evaluado la concordancia inter- e intraobservador de los parámetros histológicos más relevantes del melanoma cutáneo. Así existen varios estudios en la literatura científica que han evaluado la reproducibilidad interobservador de múltiples características histológicas de lesiones melanocíticas, algunos de ellos centrados en una sola característica y otros consideraron varias características a la vez. (7,92,100–105)

Las mayores tasas de concordancia se alcanzaron para la variable pronóstica más importante, el espesor de Breslow, un hecho predecible pues es una variable cuantitativa lo cual se asocia a una mayor objetividad en su evaluación. (92,101,103,106–110)

Por el contrario, otras variables mostraron una baja o moderada reproducibilidad tales como el nivel de Clark o el estadiaje del MM según la AJCC. (41,105,108,111–113)

Es destacable que la falta de reproducibilidad no se ha descrito únicamente entre diferentes observadores, si no también se puede objetivar en las observaciones de un mismo investigador, lo que se conoce como variabilidad intraobservador. En esta línea, el estudio conducido por Beatson y colaboradores que incluía 623 casos de MM, detectó en un 14% de los casos, discordancia en los resultados en cuanto al establecimiento del estadio del MM según la AJCC entre una primera

## DISCUSIÓN

y una segunda opinión diagnóstica de un mismo investigador, con una repercusión potencial importante en el manejo de los pacientes. Los investigadores de este estudio recomiendan una 2ª opinión diagnóstica desde el punto de vista histológico en todos los casos de MM y si se detecta discordancia, el caso debería discutirse en un comité multidisciplinar y con el propio paciente para consensuar la actitud respecto al manejo del caso. (105)

Otro estudio en el que participaron 187 patólogos de 10 estados diferentes de EE. UU. consistente en la valoración de un set de secciones histológicas de lesiones melanocíticas de todo el espectro respecto a la malignidad obtuvo buena reproducibilidad intra- e interobservador en la categorización de lesiones de los extremos del espectro (nevus o mínima atipia y melanoma invasivo) sin embargo para el resto de las categorías la concordancia intraobservador (y lógicamente menor concordancia interobservador) fue muy inferior. (100).

Nuestro estudio número 1 analiza la reproducibilidad de algunas de las características definidas en el trabajo previo de Viros y colaboradores (7).

Se dispone de otro estudio posterior realizado por varios de los investigadores del trabajo previo (7,74) que mostró valores similares de reproducibilidad, exceptuando la formación de nidos, el contorno epidérmico y la delimitación lateral cuyos valores son más bajos que los obtenidos en el estudio previo. (7)

En nuestra experiencia, observamos peores resultados de concordancia para la mayoría de las variables (tabla 12)

Asimismo, en el estudio número 1 se analizaron ciertas características adicionales, tales como la presencia del patrón discohesivo o el patrón de crecimiento que no habían sido valoradas por Viros y colaboradores en su trabajo.

CAPÍTULO 9

Tabla 13. Resultados de coeficientes kappa de las dos rondas de evaluación de nuestro estudio y del estudio de Viros et al (7) y Broekaert et al (74)

	55 CASOS (1ª RONDA)	55 CASOS (2ª RONDA)	Media de los resultados de 1ª y 2ª ronda	Viros y cols. (7)	Broekaert y cols. (74)
EXTENSIÓN PAGETOIDE	0,45	0,73	0,59	0,7	0,7
FORMACIÓN DE NIDOS	0,47	0,41	0,44	0,6	0,4
PIGMENTACIÓN	0,75	0,64	0,70	0,7	0,7
DISTRIBUCIÓN DEL PIGMENTO	ND	0,52	0,52	ND	ND
PATRÓN DE CRECIMIENTO	0,35	0,62	0,62	ND	ND
CONTORNO EPIDÉRMICO	0,39	0,41	0,40	0,5	0,4
DELIMITACIÓN LATERAL	0,32	ND	0,32	0,4	0,4
ELASTOSIS SOLAR (4 GRADOS)	0,72	ND	0,72	0,8	0,6
TIPO DE ELASTOSIS (2 GRADOS)	0,67	ND	0,67	ND	ND
MORFOLOGÍA CELULAR	0,32	0,30	0,31	ND	0,6
ULCERACIÓN	0,68	0,65	0,67	ND	ND
TIPO DE ULCERACIÓN	0,43	0,36	0,40	ND	ND
MORFOLOGÍA POLIPOIDE	0,81	ND	0,81	ND	ND
REGRESIÓN	0,51	0,52	0,52	ND	ND
NECROSIS	0,25	0,37	0,31	ND	ND
ACANTÓLISIS	0,42	0,34	0,38	ND	ND
PLEOMORFISMO	0,16	ND	0,16	ND	ND

## DISCUSIÓN

Una posible explicación para algunas de las discordancias halladas es que el MM suele ser una lesión de gran tamaño y puede mostrar franca heterogeneidad en las distintas áreas del tumor. En este sentido, en el caso de la variable presencia de nidos y la extensión pagetoide, podemos encontrar un área con gran presencia de nidos o invasión intraepidérmica en comparación con otra región tumoral adyacente que muestre ausencia de estos hallazgos, lo cual según la zona en que se fije el investigador, puede conducir a una baja reproducibilidad. Por este motivo, algunas características se observan sólo en determinadas secciones histológicas o laminillas, requiriendo cortes seriados para detectarse.

Tanto la presencia de nidos como la extensión pagetoide se redefinieron de la 1ª a la 2ª ronda y se redujeron las categorías que pasaron de 4 a 2. De hecho, mejoró sustancialmente la reproducibilidad de la extensión pagetoide mientras que la de la formación de nidos permaneció estable. Es un ejemplo de que la reagrupación de categorías de una variable puede mejorar en algunos casos su reproducibilidad o al menos mantenerla, siempre garantizando el mantenimiento de la relevancia de ésta.

Respecto a la delimitación lateral, hemos detectado que a menudo el MM puede mostrar distintas transiciones de piel afecta a piel adyacente perilesional de un lado respecto al otro de la sección que se observa en la laminilla. Así, dependería del lado que elige el evaluador para aportar un resultado. La misma justificación se podría aplicar al contorno epidérmico.

La concordancia media de la 1ª y 2ª ronda para la variable ulceración fue buena en nuestro estudio ( $k=0.67$ ), en línea con otros trabajos previos de la literatura científica. (41,92,95,105,111).

A pesar de que fue buena en la 1ª ronda, se volvió a valorar en la 2ª ronda, pues debíamos volver a valorar el tipo de ulceración y conllevaba el examen inherente de la presencia de ulceración, y se observó que se mantenía la reproducibilidad de esta ( $k= 0,68$  y  $0,65$  respectivamente).

Un motivo por el cual la concordancia no llegó a ser perfecta podría ser porque la evaluación de la ulceración solo se puede hacer en algunas secciones o cortes histológicos ya que puede afectar a un área concreta del tumor y no a toda su extensión.

Además, cuando hay una pérdida focal de epidermis puede ser problemático establecer la presencia real de esta característica, porque podemos encontrarnos ante una ulceración real o un artefacto por el tallado incorrecto de la pieza. Así mismo puede ser dificultoso distinguir entre ulceración traumática y no traumática. En este sentido resulta facilitador que exista una cicatriz dérmica o biopsia previa, que, por otra parte, no siempre está presente. (111) Respecto a la variable tipo de ulceración la concordancia tras la 2ª ronda fue débil pero cercana al valor de moderada ( $k=0,36$ ) y tras la 1ª ronda moderada ( $k=0,46$ ). Se trata en nuestra opinión de una variable difícil de valorar, pues no es habitual ni en la práctica diaria ni en la literatura científica. Debido a la baja reproducibilidad y por la difícil valoración de ésta se decidió eliminar para el estudio número 2.

La morfología celular medida de forma cualitativa mostró una concordancia discreta, y menor que en estudios previos (7,74) Obtuvimos unos valores muy similares tras la 1ª y 2ª ronda ( $k= 0,32$  y  $0,30$  respectivamente) a pesar de que se redujeron las categorías de 5 a 3 en la 2ª ronda.

Una posible explicación a este hecho es que en el MM se observa una gran heterogeneidad celular o pleomorfismo de unas localizaciones a otras del tumor, lo cual hace difícil la interpretación de esta variable. Adicionalmente, si el corte histológico es perpendicular al eje largo de la celularidad, la citomorfología podría visualizarse redondeada, o por el contrario si es tangencial podría observarse más alargada de lo que realmente es.

Para intentar solucionar los problemas de reproducibilidad de la variable para el estudio número 2, se incluyó la medición mediante una técnica semicuantitativa mediante el cociente de las medias de 5 mediciones de diámetro menor y mayor.

Esta medición también nos permitió conocer datos acerca de tamaño celular pues nos permitió calcular la media de la superficie celular tumoral. Sus resultados se incluyeron en el estudio número 2.

La variable pigmentación mostró una concordancia interobservador sustancial, en línea con otros estudios previos ( $k$  1ª ronda= $0,75$ ;  $k$  2ª ronda=  $0,64$ ). (7,74) Se volvió a valorar en la 2ª ronda para verificar de nuevo la reproducibilidad pues se simplificó en menos categorías y, además, añadimos la variable relacionada “distribución de pigmento” al observar previamente que algunas lesiones mostraban una pigmentación difusa, mientras que otras la presentaban focalmente. La variable distribución del pigmento mostró una concordancia moderada ( $k$  2ª ronda=  $0,52$ ). Esta variable fue también finalmente eliminada del estudio número 2 pues decidimos que no era relevante, pues observamos que en caso de que una lesión se consideraba pigmentada, la distribución solía ser extensa en gran parte o en la totalidad de la lesión y no focal.

La morfología polipoide mostró una concordancia interobservador casi perfecta en nuestro estudio ( $k$  1ª ronda=  $0,81$ ). Por este motivo, no se analizó en la 2ª ronda. Aunque la concordancia fue muy elevada, en ciertos casos puede ser difícil de interpretar, debido a que algunas lesiones tienden a ser más pediculadas por un lado de la lesión que por otro o que su morfología polipoide es sutil por lo que puede generar dudas para su valoración.

Respecto a la regresión, hallamos una concordancia interobservador moderada ( $k$  1ª ronda= $0,51$ ,  $k$  2ª ronda=  $0,52$ ). En la literatura científica encontramos resultados heterogéneos.

La mayor parte de estudios, que tratan de evaluar distintas características a la vez mostraron una reproducibilidad baja (106,110,114), mientras que otro estudio centrado en la regresión como única variable mostró tasas más altas. (115) Es esperable que un estudio que se centra únicamente en una característica alcance mayores niveles de concordancia interobservador que aquellos que evalúan varias variables, más aún si hay formación o entrenamiento previo, pues toda la atención se dirige a esa característica en concreto.

## DISCUSIÓN

Adicionalmente, la categorización de la regresión y su evaluación han cambiado a lo largo del tiempo, lo cual puede contribuir a la variabilidad en la concordancia. Respecto a esto, algunos estudios consideran tres grados de regresión en función de la antigüedad de esta: temprana, intermedia o tardía (108), mientras que otros consideran solo dos grados según la presencia o la ausencia de esta (110,114). En un estudio de reproducibilidad de la valoración de regresión histológica de MM finos en el que participaron 2 patólogos, obtuvieron una alta reproducibilidad respecto al establecimiento de la presencia o ausencia de esta, sin embargo, la concordancia disminuyó cuando trataron de clasificar la regresión según su momento evolutivo en temprana, intermedia o tardía. (115).

El pleomorfismo celular y la necrosis fueron unas variables que mostraron una concordancia baja, por lo que se eliminaron finalmente tras la 1ª y 2ª ronda respectivamente.

La variable pleomorfismo es muy subjetiva y las células del MM, al igual que ocurre en el caso de otros tumores malignos, son muy heterogéneas en su morfología, especialmente en algunas áreas del tumor, por lo que su valoración está sujeta a bastante subjetividad. No hemos encontrado estudios que analicen la reproducibilidad de esta variable en la literatura científica.

Respecto a la necrosis, un trabajo que incluyó 55 casos de MM y que incluyó a 9 dermatopatólogos de 8 instituciones italianas para establecer la reproducibilidad de varias características histológicas, solo halló necrosis en un caso. (102) Al ser una característica poco prevalente, que en muchas ocasiones solo afecta a un área tumoral pequeña, puede pasar desapercibida.

Por último, respecto a la acantólisis, su reproducibilidad fue discreta ( $k$  1ª ronda=0,42;  $k$  2ª ronda=0,34), se decidió mantener para el estudio 2 pues realmente nos parecía un hallazgo relevante y característico de algunas lesiones y convenía valorarlo, aunque esta variable debía interpretarse con cautela y necesitaría más entrenamiento y una definición consensuada con más patólogos para su análisis en futuros estudios.

El estudio número 1 reveló una reproducibilidad media de las variables estudiadas moderada. La reproducibilidad de las características histológicas del MM muestra una gran variabilidad de unos estudios a otros. Es conveniente en la fase preliminar de cualquier trabajo de investigación de calidad definir y clasificar adecuadamente las variables tras valorar su reproducibilidad. Una variable puede ser muy relevante, pero si su reproducibilidad es baja, sus resultados deben interpretarse con cautela o bien directamente debe eliminarse del estudio.

Una vez definidas las variables que usaríamos para el estudio 2, éste fue llevado a cabo, donde describimos que varias de las características de la lesión primaria podrían proporcionar cierta información acerca del estado mutacional de un MM, respecto a pTERT y a su posible combinación con BRAF.

Se ha descrito que la presencia de mutaciones en BRAF es un hallazgo muy frecuente en el MM (7,116), aunque también es prevalente en lesiones melanocíticas benignas(45). Sin embargo, la mutación en el pTERT es más características de lesiones melanocíticas malignas que benignas y

suele aparecer más tardíamente en la evolución de la progresión de una lesión melanocítica hacia la malignidad (45). De hecho, algunos autores, sugieren que la presencia de mutaciones en pTERT podría ayudar a inclinar la balanza a favor del diagnóstico de melanoma en aquellas lesiones melanocíticas de significado incierto. (89)

En general la presencia de la mutación en el pTERT se asocia a un pronóstico más sombrío (3,85) y se ha vinculado a algunas características de agresividad histológica como la variante histológica de MN y una mayor velocidad de crecimiento. (6)

La presencia simultánea de mutaciones en pTERT y BRAF en el MM ha sido estudiada previamente por algunos autores quienes han descrito una asociación significativa entre las mismas (85,90,117,118).

Algunos estudios reflejan el comportamiento biológico de los MM mutados en mutaciones puntuales, pero existen hasta el momento pocos trabajos que evalúen el impacto o las características de los MM con la presencia simultánea de las 2 mutaciones más frecuentes halladas hasta el momento, BRAF y pTERT a excepción de dos estudios.

El primer estudio es muy relevante, pues analiza diversas características clínico-patológicas e histológicas en caso de coexistencia de la doble mutación (BRAF+/pTERT+). Sin embargo, y aunque los resultados son interesantes, éstos son presentados con una estadística básica en la que expone las diferencias entre la distribución de variables, sin mostrar un análisis de regresión logística que permita valorar una posible asociación entre las variables del estudio. Asimismo, el tamaño muestral es pequeño, pues analiza únicamente 53 casos de MM. (4)

Aunque no encontraron una asociación estadísticamente significativa entre las 2 mutaciones, sí que observaron que el grupo de MM que portaba la doble mutación mostraba una mayor prevalencia de algunos parámetros clínico-patológicos adversos, como el espesor de Breslow, el índice mitótico, las metástasis en el ganglio centinela, la presencia de ulceración y la ausencia de regresión en comparación con los casos que presentan las mutaciones de forma aislada. (4)

El segundo estudio analizaba el comportamiento de los MM con mutaciones en los genes pTERT, y BRAF o NRAS. Observaron coocurrencia de las mutaciones pTERT y BRAF en un 26,3% de los casos y de pTERT y NRAS en un 6,9% de los casos. Hallaron una peor supervivencia y mayor prevalencia de algunas características histológicas asociadas a peor pronóstico en aquellos casos en los que coocurrían mutaciones en NRAS y pTERT o en BRAF y pTERT. Así los peores datos de supervivencia se obtuvieron para el grupo pTERT+/NRAS seguidos por el grupo pTERT-/NRAS+ y por el grupo pTERT+/BRAF+. (5)

De manera parecida, pero en otro tumor, concretamente en el carcinoma papilar de tiroides se ha descrito una asociación significativa en la coexistencia de las 2 mutaciones, así como un peor pronóstico en términos de supervivencia. (4)

## DISCUSIÓN

Es probable que las 2 mutaciones ejerzan un rol sinérgico; por un lado, la mutación en pTERT aumentaría la proliferación celular (84) y por otro, la mutación en BRAF promovería un comportamiento más agresivo (4,119). La función biológica de estos 2 genes está interconectada, pues las mutaciones en el pTERT crean puntos nuevos de unión a factores de transcripción ETS, algunos de los cuales son dianas de la vía de señalización de BRAF, y también permiten eludir la apoptosis a la que se verían abocadas las células hiperproliferativas al activar la telomerasa cuando los telómeros se acortan en el punto próximo a la crisis telomérica. (4,117)

En nuestro estudio, al valorar el patrón de crecimiento en los casos de MM, observamos que los MM pTERT+ tenían una mayor frecuencia de patrón de crecimiento expansivo que en los pTERT-.

Además, resulta interesante que, tras analizar los subgrupos de combinaciones de las mutaciones, fue el grupo BRAF-/pTERT+ el único en el que se detectó una predominancia del patrón expansivo frente al infiltrativo contrastando con el resto de los grupos. Igualmente, en el análisis multivariado se observó una relación del patrón expansivo con la presencia de la combinación BRAF-/pTERT+, una relación que se perdía en el caso de la adición de la mutación BRAF (BRAF+/pTERT+) en el que por el contrario se visualizó una ligera asociación con el patrón de crecimiento infiltrativo.

Una posible explicación a los hallazgos respecto al patrón de crecimiento es que los MM pTERT+, podrían crecer más rápido y no tienen tiempo para disecar los haces de colágeno, fenómeno característico de los tumores con patrón de crecimiento expansivo, que ejercen un efecto de empuje en la matriz peritumoral, mostrando, en la mayoría de los casos, un margen de avance redondeado con buena delimitación.

En relación con este aspecto, en un estudio de 126 casos de MM encontraron que los MM de rápido crecimiento se asociaban con la mutación en NRAS, pero no pudieron demostrar la asociación con la mutación BRAF porque la asociación no fue estadísticamente significativa (125). Posteriormente el mismo grupo de investigadores publicaron que la presencia de mutaciones en el pTERT sí que se asociaba de forma estadísticamente significativa con un aumento de la velocidad de crecimiento del MM. (6).

La variante histológica de MN desde su origen presenta una fase de crecimiento vertical y destaca por un crecimiento rápido y expansivo. En nuestro trabajo, dicha variante fue significativamente más prevalente en los MM pTERT+ que en aquellos pTERT-. Sin embargo, no hallamos una asociación significativa en el análisis univariado.

En la misma línea, en otros estudios publicados previamente, se observó una mayor prevalencia de MN en aquellos con la mutación en el pTERT. (4,85,90,118). En un estudio de 287 MM primarios, el grupo de MM con subtipo histológico de MN fue que el que mayor prevalencia de mutaciones en pTERT mostró (42/76, 55,3%) con un OR=2,80; IC=1,63-4,92; 0=0,0002) en comparación con el resto de los subtipos histológicos (85).

En nuestro análisis por subgrupos, el grupo con mayor prevalencia del tipo histológico MN fue aquel con la doble mutación (BRAF+/pTERT+), frente a la presencia de las mutaciones de forma aislada.

De forma paralela, en el estudio multivariado se observó una posible relación entre el subtipo MN y el subgrupo BRAF+/pTERT+ y por el contrario una asociación ligera entre el grupo BRAF-/pTERT- y la ausencia del subtipo MN.

En consonancia con otros estudios previos, en nuestra serie no hubo ningún caso de MLA con mutación en el pTERT (4,85,90,118) Además, en el análisis multivariado hallamos una relación entre la mutación pTERT y la ausencia de MLA.

Respecto a la ulceración, observamos los MM pTERT+ mostraron una prevalencia mayor de la misma en comparación con los no mutados. En el análisis por subgrupos de mutación se objetivó que el conjunto BRAF+/pTERT+ fue el que presentó la mayor prevalencia de ulceración respecto al resto de grupos. Esta relación se observó también en el análisis multivariado.

En líneas generales, otros estudios previos presentaron resultados similares (118) (85).

Así, un estudio que incluía una serie de 116 MM, el 53,8% de los mutados en pTERT+ mostraron ulceración, mientras sólo el 30% de los pTERT- la presentaron ( $p=0,003$ ) (OR=2,3;  $p<0,001$ ) (118).

De manera paralela, en otro trabajo sobre 287 MM hallaron una prevalencia de ulceración mayor en los MM pTERT+ respecto a los MM pTERT- (41,34% y 24,43% respectivamente) (OR=2,34, IC=1,04-5,26;  $p=0,04$ ). (85)

Por el contrario, se dispone de otro trabajo de 53 casos de MM en el que no hallaron una mayor prevalencia de ulceración en el grupo de MM pTERT+. Sin embargo, sí que detectaron una asociación significativa en los casos en que se daban simultáneamente las 2 mutaciones (BRAF+/pTERT+). (4)

El espesor de Breslow, fue en nuestro trabajo significativamente mayor en los MM pTERT+ respecto a los pTERT-.

Al analizar las combinaciones de mutaciones tanto el grupo de MM BRAF-/pTERT+ como los MM BRAF+/pTERT+ se asociaron a mayores espesores de Breslow (espesor > a 2 mm respecto al resto de grupos).

De manera paralela, en otros trabajos previos también se muestran resultados similares, aunque el modo de presentar los resultados difiere de unos estudios a otros, pues algunos consideran el valor medio del espesor de Breslow (4,118) mientras que otros tienen en cuenta el resultado medido en intervalos (5,85).

## DISCUSIÓN

Así, en un trabajo en el que consideraron 4 intervalos de espesor de Breslow, observaron que tanto la significación estadística como la medida de asociación (OR) eran crecientes a medida que los valores de los intervalos de Breslow crecían. Así, 60 de los 287 casos de MM, presentaron un espesor de Breslow >4 mm, y de éstos, 31 (61,7%) tenían la mutación en pTERT, mostrando en la regresión logística univariada una asociación significativa, siendo la OR la mayor de todas las categorías (OR=3.3; Ref=1,7-6,5; p=0,0006)(85).

En la misma línea otro trabajo halló el espesor medio de Breslow de los MM mutados en el pTERT fue más de 2 veces mayor que los no mutados (espesor medio= 8,1 mm y 2,9 mm respectivamente, p=0,02). (118)

Teniendo en cuenta las combinaciones de las mutaciones, un estudio reflejó que de las 4 combinaciones posibles entre BRAF y pTERT, el grupo BRAF+/pTERT+ fue el que mayor espesor de Breslow medio mostró con mucha diferencia respecto a los otros 3 grupos, (BRAF+/pTERT+= 7,8 mm, BRAF-/pTERT+=2,65 mm, BRAF+/pTERT-=2,62 mm BRAF-/pTERT-= 1,86 mm) (p=0,0012) (4).

Otro estudio demostró en un análisis univariado una asociación significativa a mayor espesor de Breslow en el grupo de MM BRAF-/pTERT+ y BRAF+/pTERT+.(5)

En nuestra investigación observamos una mayor prevalencia de índice mitótico elevado (>5mitosis/mm<sup>2</sup>) en los MM pTERT+ respecto a los pTERT-. En el estudio multivariado también resultó ser una variable relacionada con la mutación pTERT.

Al realizar el análisis por subgrupos, se observó que los MM BRAF+/pTERT+ presentaron una mayor prevalencia de índice mitótico elevado, seguido por el conjunto BRAF-/pTERT+. En el análisis multivariado reveló que son principalmente los MM BRAF+/pTERT+ los que se relacionaban con un índice mitótico elevado.

El índice mitótico, que junto al espesor de Breslow y la ulceración tiene una gran importancia pronóstica, guarda relación con la proliferación tumoral, de hecho, aquellos tumores con un índice mitótico elevado crecen más rápido.

A excepción de la variable patrón de crecimiento, todas fueron en nuestra investigación más prevalentes o bien su asociación fue mayor en/al grupo BRAF+/pTERT+ respecto al grupo BRAF-/pTERT+.

Así, tanto un elevado índice mitótico, como un mayor espesor de Breslow, el patrón de crecimiento expansivo, la presencia de ulceración, así como la variante de MN se han asociado en nuestra investigación a la mutación pTERT. Dichas características son causa o consecuencia de una mayor velocidad de crecimiento y definen un comportamiento más agresivo del MM y un peor pronóstico. Nuestros resultados por tanto son congruentes con los de la publicación previa de la literatura científica que se describe que los MM pTERT+ presentan más frecuentemente una mayor velocidad de crecimiento respecto a los pTERT-. (6)

En un estudio de 58 casos se observó que los MM pTERT+ presentaban un índice mitótico medio más elevado que los no mutados (5,6 y 2,8 mitosis/mm<sup>2</sup> respectivamente,  $p=0,041$ ). Además, al analizar los grupos posibles de ausencia o presencia de mutaciones BRAF y pTERT, identificaron que el valor más alto de espesor medio se correspondía con el grupo de de MM BRAF+/pTERT+ (6,73mitosis/mm<sup>2</sup>) ( $p=0,029$ ). (4)

En otro trabajo que analizaba las características de los MM con coocurrencia de mutaciones en BRAF/NRAS y pTERT se observó una asociación significativa independiente a un mayor índice mitótico en el grupo pTERT+ y aún más intensa en el grupo BRAF+/NRAS+(5).

Un hallazgo llamativo en nuestra investigación fue que los MM pTERT+ presentaban característicamente un aumento de la elastosis solar tipo CSD en comparación con los no mutados. Al analizar este dato en los casos con escasa o nula elastosis, se objetivó que los MM pTERT+ tendían a presentar más elastosis ligera (NO CSD) frente a la ausencia de elastosis (52,4%) en comparación con los MM pTERT-.

Al realizar el análisis por subgrupos de mutación, fue el grupo de MM BRAF-/pTERT+ el que mayor prevalencia de elastosis CSD presentó frente al resto de grupos. En el estudio multivariado también observamos una relación entre la presencia de la mutación pTERT y la elastosis intensa (CSD), y teniendo en cuenta también la mutación simultánea BRAF se observó una relación entre la elastosis CSD con el grupo BRAF-/pTERT+. Sin embargo, en el grupo BRAF+/pTERT+ se objetivó la tendencia contraria, es decir, la adición de la mutación BRAF a la mutación pTERT se relacionó de forma débil con la ausencia de elastosis.

Ante lo descrito previamente, la presencia de elastosis intensa parece ser un hallazgo característico de la mutación en pTERT, por el contrario, nada característico de la mutación exclusiva en BRAF. Así se ha visto que los MM con mutación en BRAF no suelen localizarse en áreas con signos de daño solar donde la presencia de lentigos solares es llamativa, o en zonas de piel fotoexpuesta a diferencia de los MM que además de la mutación en BRAF también presentan la mutación en pTERT que si se asocian a estas características. (5)

Por otro lado, otros estudios describieron una asociación de las mutaciones espontáneas en pTERT a la exposición solar crónica y a la exposición solar intermitente (85). De hecho, las mutaciones en pTERT se han visto asociadas a la radiación ultravioleta (UV) con una alta tasa de transiciones C>T y CC>TT en las secuencias de dímeros de pirimidina (118,121). La elastosis solar es un fenómeno que aparece como consecuencia del daño solar acumulado a lo largo de la vida, lo cual es concordante con los hallazgos descritos y los de nuestro estudio.

A pesar de que los estudios en la literatura reflejan lo contrario, tanto estos como el nuestro contrastan con un estudio de 189 casos de MM en el cuál no encontraron una asociación significativa entre la presencia de la mutación en el pTERT y la presencia de elastosis intensa. (122)

Asimismo, la ausencia de asociación de elastosis solar a la mutación en BRAF en nuestro trabajo, es un fenómeno que se ha descrito en estudios previos. (5,85,123–125)

## DISCUSIÓN

Nos planteamos la hipótesis de que quizás la mayor prevalencia de elastosis intensa favorezca el crecimiento expansivo del MM, al encontrarse la masa tumoral con una “barrera” de material elástico, fenómeno también más prevalente en nuestro trabajo en los MM BRAF-/pTERT+ respecto al resto de combinaciones.

Los MM pTERT+ mostraron una menor tendencia a formar nidos intraepidérmicos en comparación con los no mutados. No encontramos una explicación lógica a este fenómeno. Es posible, que las mutaciones en pTERT condicionen una fase de crecimiento radial con mayor frecuencia de tipo lentiginoso, pero esta afirmación es una mera especulación que requeriría de otro tipo de estudios para poder corroborarla. Hasta el momento, no hay evidencia en la literatura científica de una asociación negativa de la tendencia a formar nidos en los MM con mutación en pTERT. Al observar los subgrupos de mutación, detectamos una asociación negativa significativa entre la presencia de nidos y la variante BRAF-/pTERT+ y cercana a la significación estadística con la variante BRAF+/pTERT-. Por el contrario, las lesiones melanocíticas con mutación en BRAF se han asociado positivamente con una tendencia a presentar grandes nidos confluentes intraepidérmicos y en la unión dermo-epidérmica, fenómeno que nosotros no hemos observado en nuestra serie (126)(7).

Respecto a la pigmentación de las lesiones, en nuestro estudio detectamos un mayor porcentaje de MM pTERT+ con escasa o nula pigmentación en comparación con los MM pTERT-.

En un estudio de 1.254 casos de MM, compararon los casos de MM amelanóticos e hipomelanóticos con los pigmentados y detectaron una mayor tendencia en los primeros a presentar el genotipo MC1R R/R además de ciertas características fenotípicas como el pelo rojo, los lentigos en el dorso de manos y una tendencia a haber padecido de quemaduras solares. (127) En consecuencia, quizás exista una posible asociación entre la mutación en pTERT con algunas variantes de MC1R que podrían explicar nuestros hallazgos. De hecho, un estudio describió una asociación significativa entre las mutaciones en el pTERT y la presencia de variantes no-sinónimas de MC1R. La asociación fue estadísticamente significativa para los individuos con fototipos III-IV y con los MM localizados en la piel sin signos de daño solar crónico. (128).

Este hallazgo podría justificar en parte algunos de los hallazgos que hemos detectado más frecuentemente en los MM mutados en pTERT, como un mayor espesor de Breslow o la presencia de ulceración. Los MM amelanóticos suelen pasar desapercibidos, se diagnostican en estadios más avanzados, con un mayor espesor de Breslow y, en ocasiones, cuando ya presentan ulceración.

Tras realizar el análisis por subgrupos, es destacable que el grupo BRAF-/pTERT+ fue el que mayor porcentaje de MM hipomelanóticos/amelanóticos mostró. En el estudio multivariado igualmente se detectó una posible relación entre el grupo BRAF-/pTERT+ y la ausencia de pigmentación de la lesión.

En cuanto a la pigmentación de los MM con mutación en BRAF los resultados son dispares. Un grupo de investigadores describió que los melanomas con mutación en BRAF tendían a presentar

mayor pigmentación que los no mutados, y postularon que podría deberse a una cooperación de MITF y BRAF. (7) Por el contrario, otro grupo encontró una alta presencia de mutaciones BRAF en MM amelanóticos (70,3%) aún mayor en MM finos (89%). (129)

Otra característica que observamos asociada a la mutación en pTERT fue la presencia de morfología polipoide. Es destacable que, al realizar el análisis por subgrupos de mutaciones, se observó una prevalencia aumentada de morfología polipoide del grupo BRAF+/pTERT+ y del grupo BRAF+/pTERT- respecto al resto de combinaciones. En el análisis multivariante se observó una posible relación del grupo BRAF+/pTERT+ con la presencia de morfología polipoide. Al igual que sucedía con la variante histológica de MN, que fue más prevalente en el grupo de MM BRAF+/pTERT+, los resultados respecto a la morfología polipoide son reproducibles. Este hallazgo no resulta extraño pues la morfología polipoide se considera una variante de pronóstico aún más sombrío de MN. (130).

Respecto al patrón discohesivo, objetivamos una asociación con la presencia de la mutación en pTERT. En el análisis por subgrupos de mutación, detectamos una asociación positiva entre la doble mutación (BRAF+/pTERT+) y la presencia del patrón discohesivo. El patrón discohesivo se ha asociado en algunos tumores a un pronóstico más sombrío, como en el caso del cáncer de pulmón. (131) En el melanoma ha sido escasamente descrito y se desconoce su implicación en el pronóstico. Además, casi todos los casos describen el patrón si se observa en su porción intraepidérmica o suprabasal. (132–134). Sin embargo, nosotros hemos encontrado algunos casos con este hallazgo únicamente en la porción dérmica y tan solo consideramos la presencia de este hallazgo si era llamativo en tal localización. No obstante, es un hallazgo difícil de objetivar pues en ocasiones sólo se observa en algunos cortes o secciones del tumor. Además, en ocasiones podría tratarse de un artefacto debido a la fijación en formol defectuosa, por ello, tuvimos en cuenta únicamente los casos en los que visualizamos claramente una discohesión intercelular con los bordes redondeados de las mismas, recordándonos a la observada en otros procesos acantolíticos clásicos como el pénfigo vulgar. Planteamos la hipótesis de que los MM pTERT+ al crecer más rápido provocarían una ruptura de las uniones intercelulares que aportaría este patrón discohesivo en algunas áreas del tumor.

Los MM mutados en pTERT mostraron una tendencia a la mayor prevalencia de invasión vascular. No observamos diferencias estadísticamente significativas ni en el análisis de regresión logística univariada ni en el análisis de subgrupos de mutación, quizás por la baja prevalencia de esta característica.

Los MM pTERT+ tenían melanocitos de mayor tamaño, tal y cómo observamos al evaluar el área celular. Además, en nuestro estudio observamos que la presencia de la mutación en BRAF confería un tamaño celular grande, más aún si se combina con la mutación en pTERT.

En la misma línea, y refiriéndonos sólo a BRAF, Viros y colaboradores describieron un mayor tamaño celular de los MM BRAF+ (112,8  $\mu\text{m}^2$ ) en comparación con los mutados en NRAS (85,4  $\mu\text{m}^2$ ) y los no mutados (89,3  $\mu\text{m}^2$ ). Sin embargo, vemos en su cálculo del área celular de su estudio que sus resultados son en general muy inferiores a los nuestros. Al analizar la metodología de su

## DISCUSIÓN

estudio, observamos que calcularon el área celular únicamente realizando el producto del diámetro mayor y el menor. No obstante, consideramos que esta fórmula fue una estimación menos precisa, pues el cálculo de la superficie celular de una elipse es el producto del diámetro mayor, el menor y el número ( $\pi$ ). De realizarse este ajuste, sus resultados se amplificarían algo más de tres veces y serían más concordantes con nuestros resultados.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariado de los datos para las variables, regresión, nevo previo, infiltrado linfocítico intratumoral, satelitosis microscópica, invasión perineural ni morfología celular.

Nuestro estudio presenta una serie de limitaciones que deben tenerse en cuenta para la interpretación final de los resultados: 1. Debido a la complejidad del estudio se trata de un estudio unicéntrico con una muestra de población pequeña. 2. El carácter retrospectivo del contenido puede generar un sesgo de memoria de aquellos datos no registrados previamente en la base de datos. 3. El hecho de que el estudio sea unicéntrico y la particularidad de que el IVO es un centro monográfico de cáncer puede conllevar a un sesgo de selección debido a una mayor prevalencia de melanoma avanzado o invasivo frente a formas menos invasivas, lo cual puede influir en los resultados respecto al hallazgo de características más agresivas de los MM. 4. Los resultados encontrados en el análisis discriminante de datos parciales (PLSDA) de los casos con mutación pTERT como en el de los casos con las distintas combinaciones de las mutaciones pTERT y BRAF presentaron una tasa de error en torno al 30% por lo que, aunque encontramos posibles relaciones entre las variables, estas deben ser consideradas con cautela.

En nuestro estudio número 2 hemos hallado múltiples características histológicas que se asocian de manera significativa con la presencia de la mutación en pTERT, fundamentalmente en el análisis univariado. Algunas de ellas se observan también en el análisis multivariado. Estas características, que a veces confieren un peor pronóstico en términos de supervivencia global podrían en parte justificar o ayudar a la interpretación de por qué los MM con mutación en pTERT tienen un comportamiento más agresivo. Por otra parte, otras características de las cuales se desconoce su implicación pronóstica y que no se suelen describir en un examen histológico convencional, parecen relacionarse con la presencia de la mutación en pTERT. Son necesarios más estudios con un mayor tamaño muestral para demostrar si estas características son útiles para predecir el estatus genético del MM. Estos estudios nos permitirían estratificar los MM por su potencial agresividad y nos ayudarían a tomar decisiones cada vez más acertadas y precisas para optimizar el manejo de los casos.



# ***10. Conclusiones***

---



## CONCLUSIONES

1. La reproducibilidad media de las variables histológicas de melanoma maligno incluidas en nuestro estudio de concordancia fue moderada. Así la extensión pagetoide, la pigmentación, el patrón de crecimiento, la elastosis, la morfología polipoide y la ulceración mostraron una concordancia sustancial. La formación de nidos, el contorno epidérmico, la distribución del pigmento y la regresión presentaron una concordancia moderada. Por último, la morfología celular, el tipo de ulceración, la delimitación lateral, la necrosis, el pleomorfismo y el patrón discohesivo mostraron una concordancia baja.
2. La presencia de mutaciones en pTERT se relacionó con la elastosis tipo CSD (“chronic sun-induced damage), un índice mitótico elevado y tipos histológicos diferentes al lentiginoso acral.
3. Las características asociadas a la mutación pTERT diferían según la presencia o ausencia simultánea de mutaciones en BRAF. Los MM BRAF-/pTERT+ tenían ausencia de pigmentación, un patrón de crecimiento expansivo y la presencia de elastosis intensa, mientras que los MM BRAF+/pTERT+ eran característicamente nodulares, con una morfología polipoide, ulcerados y con un Breslow y un índice mitótico elevados.



# *11. Bibliografía*

1. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L G LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* [Internet]. 2013;339(February):957–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348506>
2. Gandini S, Zanna I, De Angelis S, Palli D, Raimondi S, Ribero S, et al. TERT promoter mutations and melanoma survival: A comprehensive literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2021;160(March):103288. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103288>
3. Nagore E, Heidenreich B, Rachakonda S, Garcia-Casado Z, Requena C, Soriano V, et al. TERT promoter mutations in melanoma survival. *Int J Cancer*. 2016;139(1).
4. Macerola E, Loggini B, Giannini R, Garavello G, Giordano M, Proietti A, et al. Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in cutaneous melanoma is associated with more clinicopathological features of aggressiveness. *Virchows Arch*. 2015 Aug;467(2):177–84.
5. Manrique-Silva E, Rachakonda S, Millán-Esteban D, García-Casado Z, Requena C, Través V, et al. Clinical, environmental and histological distribution of BRAF, NRAS and TERT promoter mutations among patients with cutaneous melanoma: a retrospective study of 563 patients\*. *Br J Dermatol*. 2021;184(3):504–13.
6. Nagore E, Heidenreich B, Requena C, García-Casado Z, Martorell-Calatayud A, Pont-Sanjuan V, et al. TERT promoter mutations associate with fast-growing melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29(2):236–8.
7. 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* [Internet]. 2008;5(6):e120. Available from: <http://www.plosmedicine.org/article/info:doi/10.1371/journal.pmed.0050120>
8. Urban K, Mehrmal S, Uppal P, Giesey RL, Delost GR. The global burden of skin cancer: A longitudinal analysis from the Global Burden of Disease Study, 1990–2017. *JAAD Int* [Internet]. 2021;2:98–108. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdin.2020.10.013>
9. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J cancer*. 2010 Dec;127(12):2893–917.
10. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 25]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
11. Sinclair C, Foley P. Skin cancer prevention in Australia. *Br J Dermatol*. 2009 Nov;161 Suppl:116–23.

## BIBLIOGRAFÍA

12. Welch HG, Woloshin S, Schwartz LM. Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study. *BMJ*. 2005 Sep;331(7515):481.
13. Swerlick RA, Chen S. The melanoma epidemic. Is increased surveillance the solution or the problem? *Arch Dermatol*. 1996 Aug;132(8):881–4.
14. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol*. 2009 Jul;129(7):1666–74.
15. Waldmann A, Nolte S, Weinstock MA, Breitbart EW, Eisemann N, Geller AC, et al. Skin cancer screening participation and impact on melanoma incidence in Germany--an observational study on incidence trends in regions with and without population-based screening. *Br J Cancer*. 2012 Feb;106(5):970–4.
16. Breitbart EW, Waldmann A, Nolte S, Capellaro M, Greinert R, Volkmer B, et al. Systematic skin cancer screening in Northern Germany. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Feb;66(2):201–11.
17. Baade P, Coory M. Trends in melanoma mortality in Australia: 1950-2002 and their implications for melanoma control. *Aust N Z J Public Health*. 2005 Aug;29(4):383–6.
18. Jemal A, Saraiya M, Patel P, Cherala SS, Barnholtz-Sloan J, Kim J, et al. Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Nov;65(5 Suppl 1):S17-25.e1-3.
19. Pollack LA, Li J, Berkowitz Z, Weir HK, Wu X-C, Ajani UA, et al. Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Nov;65(5 Suppl 1):S78-86.
20. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-Garcia C, Rodriguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016 May;107(4):318–28.
21. Gerhenwald J, Scolyer R, Hess K, Thompson JF. Melanoma of the skin. In: Mb A, Sb E, Fl G et al, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer International Publishing; 2017. p. 566–85.
22. 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 Nov;67(6):472–92.
23. Gamba CS, Clarke CA, Keegan THM, Tao L, Swetter SM. Melanoma survival disadvantage in young, non-Hispanic white males compared with females. *JAMA dermatology*. 2013 Aug;149(8):912–20.

24. Joosse A, de Vries E, Eckel R, Nijsten T, Eggermont AMM, Holzel D, et al. Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):719–26.
25. Kindem S, Garcias-Ladaria J, Requena C, Guillen C, Oliver V, Nagore E. Survival advantage of women in localized melanoma mainly relies on clinical-pathological differences by sex. A retrospective study of 1,607 patients in Valencia, Spain. *Eur J Dermatol*. 2015;25(3):247–54.
26. Ettl T, Irga S, Muller S, Rohrmeier C, Reichert TE, Schreml S, et al. Value of anatomic site, histology and clinicopathological parameters for prediction of lymph node metastasis and overall survival in head and neck melanomas. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014 Jul;42(5):e252-8.
27. Fadaki N, Li R, Parrett B, Sanders G, Thummala S, Martineau L, et al. Is head and neck melanoma different from trunk and extremity melanomas with respect to sentinel lymph node status and clinical outcome? *Ann Surg Oncol*. 2013 Sep;20(9):3089–97.
28. Bian SX, Hwang L, Hwang J, Ragab O, In GK, Peng D, et al. Acral lentiginous melanoma—Population, treatment, and survival using the NCDB from 2004 to 2015. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021 Nov;34(6):1049–61.
29. Huang K, Fan J, Misra S. Acral Lentiginous Melanoma: Incidence and Survival in the United States, 2006-2015, an Analysis of the SEER Registry. *J Surg Res*. 2020 Jul;251:329–39.
30. Howard M, Xie C, Wee E, Wolfe R, McLean C, Kelly JW, et al. Acral lentiginous melanoma: Clinicopathologic and survival differences according to tumour location. *Australas J Dermatol*. 2020 Nov;61(4):312–7.
31. Calomarde-Rees L, García-Calatayud R, Requena Caballero C, Manrique-Silva E, Traves V, García-Casado Z, et al. Risk Factors for Lymphatic and Hematogenous Dissemination in Patients with Stages i to II Cutaneous Melanoma. *JAMA Dermatology*. 2019;155(6):679–87.
32. Balch CM, Thompson JF, Gershenwald JE, Soong S-J, Ding S, McMasters KM, et al. Age as a predictor of sentinel node metastasis among patients with localized melanoma: an inverse correlation of melanoma mortality and incidence of sentinel node metastasis among young and old patients. *Ann Surg Oncol*. 2014 Apr;21(4):1075–81.
33. Balch CM, Soong S, Gershenwald JE, Thompson JF, Coit DG, Atkins MB, et al. Age as a prognostic factor in patients with localized melanoma and regional metastases. *Ann Surg Oncol*. 2013 Nov;20(12):3961–8.
34. Bartlett EK, Karakousis GC. Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015 Apr;24(2):215–27.

## BIBLIOGRAFÍA

35. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jackel A, Uhl K, Waldmann V, et al. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol*. 1999 Jun;17(6):1891–6.
36. Campora E, Repetto L, Giuntini P, Bertelli G, Amoroso D, Sertoli MR, et al. LDH in the follow-up of stage I malignant melanoma. Vol. 24, *European journal of cancer & clinical oncology*. England; 1988. p. 277–8.
37. Shoji Y, Bustos MA, Gross R, Hoon DSB. Recent Developments of Circulating Tumor Cell Analysis for Monitoring Cutaneous Melanoma Patients. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4):1–17.
38. Slingluff CLJ, Vollmer RT, Reintgen DS, Seigler HF. Lethal “thin” malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg*. 1988 Aug;208(2):150–61.
39. Tas F, Erturk K. Presence of histological regression as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients. *Melanoma Res*. 2016;26(5):492–6.
40. El Sharouni MA, Aivazian K, Witkamp AJ, Sigurdsson V, Van Gils CH, Scolyer RA, et al. Association of Histologic Regression with a Favorable Outcome in Patients with Stage 1 and Stage 2 Cutaneous Melanoma. *JAMA Dermatology*. 2021;157(2):166–73.
41. Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. [Problems in defining melanoma regression and prognostic implication]. *Actas Dermosifiliogr [Internet]*. 2009;100(9):759–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889297>
42. Botella-Estrada R, Traves V, Requena C, Guillen-Barona C, Nagore E. Correlation of histologic regression in primary melanoma with sentinel node status. *JAMA Dermatology*. 2014;150(8):828–35.
43. 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 Jun;1(3):359–68.
44. Wong PF, Wei W, Gupta S, Smithy JW, Zeltermann D, Kluger HM, et al. Multiplex quantitative analysis of cancer-associated fibroblasts and immunotherapy outcome in metastatic melanoma. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):2442–9.
45. 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 [Internet]*. 2015 Nov;373(20):1926–36. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1502583>
46. Bastian BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene*. 2003 May;22(20):3081–6.

47. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, Godfrey T, Moore DH 2nd, Brocker EB, et al. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res.* 2000 Apr;60(7):1968–73.
48. Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Zehngbot L, Lusk E, Van Horn M, et al. Invasive malignant melanomas lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol.* 1984;6 Suppl:55–61.
49. Clark WHJ, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969 Mar;29(3):705–27.
50. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970 Nov;172(5):902–8.
51. Armstrong, A W; Liu, W; Mihm MC. Pathologic characteristics of melanoma [Internet]. UpToDate. 2018. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/pathologic-characteristics-of-melanoma>
52. Schmoeckel C, Castro CE, Braun-Falco O. Nevoid malignant melanoma. *Arch Dermatol Res.* 1985;277(5):362–9.
53. Lee DA, Cohen JA, Twaddell WS, Palacios G, Gill M, Levit E, et al. Are all melanomas the same? Spitzoid melanoma is a distinct subtype of melanoma. *Cancer.* 2006 Feb;106(4):907–13.
54. Conley J, Lattes R, Orr W. Desmoplastic malignant melanoma (a rare variant of spindle cell melanoma). *Cancer.* 1971 Oct;28(4):914–36.
55. Wharton JM, Carlson JA, Mihm MCJ. Desmoplastic malignant melanoma: diagnosis of early clinical lesions. *Hum Pathol.* 1999 May;30(5):537–42.
56. Lee CC, Faries MB, Ye X, Morton DL. Solitary dermal melanoma: beginning or end of the metastatic process? *Ann Surg Oncol.* 2009 Mar;16(3):578–84.
57. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 2006 Aug;20(16):2149–82.
58. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007 Feb;445(7130):843–50.
59. Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet.* 2003;37:67–90.
60. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell.* 2007 Mar;128(5):853–64.

## BIBLIOGRAFÍA

61. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2003 Dec;9(17):6483–8.
62. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet.* 2015 Sep;47(9):996–1002.
63. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015 Jun;161(7):1681–96.
64. Sullivan R, Fisher D. The molecular biology of melanoma [Internet]. UpToDate. 2019. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/the-molecular-biology-of-melanoma>
65. Chowdhary M, Patel KR, Danish HH, Lawson DH, Khan MK. BRAF inhibitors and radiotherapy for melanoma brain metastases: Potential advantages and disadvantages of combination therapy. *Onco Targets Ther.* 2016;9:7149–59.
66. Dong J, Phelps RG, Qiao R, Yao S, Benard O, Ronai Z, et al. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res.* 2003 Jul;63(14):3883–5.
67. Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res.* 2006 Aug;16(4):267–73.
68. Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, et al. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Br J Cancer.* 2011 Feb;104(3):464–8.
69. Lin J, Takata M, Murata H, Goto Y, Kido K, Ferrone S, et al. Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Oct;101(20):1423–7.
70. Hodis E, Watson IR, Kryukov G V, Arold ST, Imielinski M, Theurillat J-P, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012 Jul;150(2):251–63.
71. 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).
72. Heppt M V, Siepmann T, Engel J, Schubert-Fritschle G, Eckel R, Mirlach L, et al. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer.* 2017 Aug;17(1):536.
73. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 2014 Jul;111(2):292–9.

74. Broekaert SMC, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Dec;23(6):763–70.
75. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 Dec;25:585–621.
76. Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell.* 1982 May;29(1):245–55.
77. Greider CW. Telomerase is processive. *Mol Cell Biol.* 1991 Sep;11(9):4572–80.
78. Gunes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell.* 2013 Jan;152(3):390–3.
79. Murnane JP. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat Res.* 2012 Feb;730(1–2):28–36.
80. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet.* 2010 May;11(5):319–30.
81. Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* 2008 Aug;99(8):1528–38.
82. Heaphy CM, Subhawong AP, Hong S-M, Goggins MG, Montgomery EA, Gabrielson E, et al. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am J Pathol.* 2011 Oct;179(4):1608–15.
83. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science.* 2011 Jul;333(6041):425.
84. Vinagre J, Pinto V, Celestino R, Reis M, Populo H, Boaventura P, et al. Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker? *Virchows Arch.* 2014 Aug;465(2):119–33.
85. Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, Garcia-Casado Z, Requena C, Traves V, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nat Commun [Internet].* 2014;5:3401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569790>
86. Bataille V, Kato BS, Falchi M, Gardner J, Kimura M, Lens M, et al. Nevus size and number are associated with telomere length and represent potential markers of a decreased senescence in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jul;16(7):1499–502.

## BIBLIOGRAFÍA

87. Rachakonda S, Kong H, Srinivas N, Garcia-Casado Z, Requena C, Fallah M, et al. Telomere length, telomerase reverse transcriptase promoter mutations, and melanoma risk. *Genes Chromosome Cancer*. 2018;57(11):564–72.
88. Andres-Lencina JJ, Rachakonda S, Garcia-Casado Z, Srinivas N, Skorokhod A, Requena C, et al. TERT promoter mutation subtypes and survival in stage I and II melanoma patients. *Int J cancer*. 2019 Mar;144(5):1027–36.
89. Thomas NE, Edmiston SN, Tsai YS, Parker JS, Googe PB, Busam KJ, et al. Utility of TERT Promoter Mutations for Cutaneous Primary Melanoma Diagnosis. *Am J Dermatopathol*. 2019 Apr;41(4):264–72.
90. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, Schilling B, Livingstone E, Potrony M, et al. TERT Promoter Mutation Status as an Independent Prognostic Factor in Cutaneous Melanoma. *JNCI J Natl Cancer Inst [Internet]*. 2014;106(9):dju246–dju246. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/dju246>
91. 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 Jul;313(5786):521–2.
92. Scolyer RA, Bs MB, Shaw HM, Thompson JF, Li LL, Colman MH, et al. Interobserver Reproducibility of Histopathologic Prognostic Variables in Primary Cutaneous Melanomas. 2003;27(12):1571–6.
93. Plotnick H, Rachmaninoff N, VandenBerg HJJ. Polypoid melanoma: a virulent variant of nodular melanoma. Report of three cases and literature review. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Nov;23(5 Pt 1):880–4.
94. Dini M, Quercioli F, Caldarella V, Gaetano M, Franchi A, Agostini T. Head and neck polypoid melanoma. *J Craniofac Surg*. 2012 Jan;23(1):e23-5.
95. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Tumor necrosis is a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(10):1477–82.
96. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics [Internet]*. 1977;33(1):159. Available from: <http://www.jstor.org/stable/2529310?origin=crossref>
97. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas*. 1960;
98. Cohen J. Weighted kappa: Nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull*. 1968;70(4):213–20.

99. Fleiss JL, Cohen J, Everitt BS. Large sample standard errors of kappa and weighted kappa. *Psychol Bull.* 1969;
100. Elmore JG, Elder DE, Barnhill RL, Knezevich SR, Longton GM, Titus LJ, et al. Concordance and Reproducibility of Melanoma Staging According to the 7th vs 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *JAMA Netw open.* 2018 May;1(1).
101. Murali R, Hughes MT, Fitzgerald P. Interobserver Variation in the Histopathologic Reporting of Key Prognostic Parameters , Particularly Clark Level , Affects Pathologic Staging of Primary Cutaneous Melanoma. 2009;249(4):641–7.
102. Urso C, Rongioletti F, Innocenzi D, Saieva C, Batolo D, Chimenti S, et al. Interobserver reproducibility of histological features in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Pathol.* 2005;58(11):1194–8.
103. Eriksson H, Hedblad MFM, Hellborg H, J LK, Krawiec K, Lundh B, et al. Interobserver Variability of Histopathological Prognostic Parameters in Cutaneous Malignant Melanoma : Impact on Patient Management. *Acta dermato-veneorologica.* 2013;93(4):411–6.
104. Niebling MG, Haydu LE, Karim RZ, Thompson JF, Scolyer RA. Reproducibility of AJCC staging parameters in primary cutaneous melanoma: An analysis of 4,924 cases. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(12):3969–75.
105. Beatson M, Eleryan MG, Reserva J, Kaufman B, Connelly B, Dugan EM, et al. Importance of pathology review to complement clinical management of melanoma. *J Am Acad Dermatol [Internet].* 2020;83(6):1784–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2020.03.093>
106. Corona R, Mele A, Amini M, De Rosa G, Coppola G, Piccardi P, et al. Interobserver variability on the histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma and other pigmented skin lesions. *J Clin Oncol.* 1996 Apr;14(4):1218–23.
107. Colloby PS, West KP, Fletcher A. Observer variation in the measurement of Breslow depth and Clark's level in thin cutaneous malignant melanoma. *J Pathol.* 1991 Mar;163(3):245–50.
108. Prade M, Sancho-Garnier H, Cesarini JP, Cochran A. Difficulties encountered in the application of Clark classification and the Breslow thickness measurement in cutaneous malignant melanoma. *Int J cancer.* 1980 Aug;26(2):159–63.
109. Heenan PJ, Matz LR, Blackwell JB, Kelsall GR, Singh A, ten Seldam RE, et al. Inter-observer variation between pathologists in the classification of cutaneous malignant melanoma in western Australia. *Histopathology.* 1984 Sep;8(5):717–29.

## BIBLIOGRAFÍA

110. Lock-Andersen J, Hou-Jensen K, Hansen JP, Jensen NK, Sogaard H, Andersen PK. Observer variation in histological classification of cutaneous malignant melanoma. *Scand J Plast Reconstr Surg hand Surg*. 1995 Jun;29(2):141–8.
111. Duray PH, DerSimonian R, Barnhill R, Stenn K, Ernstoff MS, Fine J, et al. An analysis of interobserver recognition of the histopathologic features of dysplastic nevi from a mixed group of nevocytic lesions. *J Am Acad Dermatol*. 1992 Nov;27(5 Pt 1):741–9.
112. Gerami P, Busam K, Cochran A, Cook MG, Duncan LM, Elder DE, et al. Histomorphologic Assessment and Interobserver Diagnostic Reproducibility of Atypical Spitzoid. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(7):934–40.
113. Bønnelykke-Behrndtz-Behrndtz ML, Schmidt H, Christensen IJ, Damsgaard TE, Møller HJ, Bastholt L, et al. Prognostic stratification of ulcerated melanoma not only the extent matters. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(6):845–56.
114. Heenan PJ, Matz LR, Blackwell JB, Kelsall GR, Singh A, ten Seldam RE, et al. Inter-observer variation between pathologists in the classification of cutaneous malignant melanoma in western Australia. *Histopathology*. 1984 Sep;8(5):717–29.
115. Kang S, Barnhill RL, Mihm MCJ, Sober AJ. Histologic regression in malignant melanoma: an interobserver concordance study. *J Cutan Pathol*. 1993 Apr;20(2):126–9.
116. Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M, Pyrhönen S, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: A possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2003;9(9):3362–8.
117. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;(February):959–61.
118. Pópulo H, Boaventura P, Vinagre J, Batista R, Mendes A, Caldas R, et al. TERT promoter mutations in skin cancer: The effects of sun exposure and X-irradiation. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2251–7.
119. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855–67.
120. Nagore E, Hacker E, Martorell-Calatayud A, Traves V, Guillen C, Hayward NK, et al. Prevalence of BRAF and NRAS mutations in fast-growing melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(3):429–31.
121. Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2005;571(1-2 SPEC. ISS.):3–17.

122. Lade-Keller J, Yuusufi S, Riber-Hansen R, Steiniche T, Stougaard M. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations and solar elastosis in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2018;28(5):398–409.
123. 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):1878–80.
124. Bauer J, Büttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, 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.
125. 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.
126. Kiuru M, Tartar DM, Qi L, Chen D, Yu L, Konia T, et al. Improving classification of melanocytic nevi: Association of BRAF V600E expression with distinct histomorphologic features. *J Am Acad Dermatol.* 2018;79(2):221–9.
127. Rayner JE, McMeniman EK, Duffy DL, De'Ambrosis B, Smithers BM, Jagirdar K, et al. Phenotypic and genotypic analysis of amelanotic and hypomelanotic melanoma patients. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2019;33(6):1076–83.
128. Nagore E, Reyes-Garcia D, Heidenreich B, Garcia-Casado Z, Requena C, Kumar R. TERT promoter mutations associate with MC1R variants in melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017;30(2):273–5.
129. Massi D, Pinzani P, Simi L, Salvianti F, De Giorgi V, Pizzichetta MA, et al. BRAF and KIT somatic mutations are present in amelanotic melanoma. *Melanoma Res.* 2013;23(5):414–9.
130. Manci E, Balch CM, Murad T, Soong SJ. Polypoid melanoma, a virulent variant of the nodular growth pattern. *Am J Clin Pathol.* 1981;75(6):810–5.
131. Rokutan-Kurata M, Yoshizawa A, Nakajima N, Teramoto Y, Sumiyoshi S, Kondo K, et al. Discohesive growth pattern (Disco-p) as an unfavorable prognostic factor in lung adenocarcinoma: an analysis of 1062 Japanese patients with resected lung adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2020;33(9):1722–31.
132. Kartono F, Shitabata PK, Magro CM, Rayhan D. Discohesive malignant melanoma simulating a bullous dermatoses. *J Cutan Pathol.* 2009;36(2):274–9.
133. Botet MV, Sánchez JL. Vesiculation of Focal Acantholytic Dyskeratosis in Acral Lentiginous Malignant Melanoma. *J Dermatol Surg Oncol.* 1979;5(10):798–800.

## BIBLIOGRAFÍA

134. Schaeppi H, Bauer JW, Hametner R, Metze D, Ortiz-Urda S, Salmhofer W, et al. A localized variant of paraneoplastic pemphigus: Acantholysis associated with malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 2001;144(6):1249–54.
135. Hacker E, Nagore E, Cerroni L, Woods SL, Hayward NK, Chapman B, et al. NRAS and BRAF mutations in cutaneous melanoma and the association with MC1R genotype: findings from Spanish and Austrian populations. *J Invest Dermatol.* 2013 Apr;133(4):1027–33.



## *12. Anexos*

## ANEXO 1: Determinación del estado mutacional

### 1. Análisis genético de BRAF

#### 1.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN se llevó a cabo sobre bloques representativos del tumor, con un alto porcentaje de células tumorales (>50%), del mismo del que se realizó el estudio inmunohistoquímico. Se emplearon cinco cortes de 5 µm de grosor de la muestra incluida en parafina. En los casos en que el porcentaje de células tumorales fue inferior al establecido, se realizó la selección del material de la zona tumoral mediante disección con un tissue- arrayer manual (Beecher TMA-421) tomando varios cilindros del área tumoral. El tejido se desparafinó y se digirió con proteinasa K (20mg/ml de tampón de lisis) a 56o. Tras la digestión se procedió a la purificación de ADN empleando el kit de purificación “QIAamp® DNA Mini kit” (QIAGEN).

Una vez diluido el ADN se pudo emplear directamente para llevar a cabo las amplificaciones, en otros caso se congeló a -20oC hasta su uso.

#### 1.2 Detección de mutaciones en BRAF.

El análisis de la mutación de V600E del gen BRAF se realizó mediante amplificación del exón 15 según lo descrito por Hacker y colaboradores. (135)

### 2. Análisis genético de TERT

#### 2.1 Procedimiento de detección de mutaciones en la región promotora de TERT.

El análisis de las mutaciones de la región promotora del gen TERT (desde la posición -27 a -286 desde el sitio de inicio ATG) se realizó mediante amplificación con cebadores específicos y posterior secuenciación Sanger.

La PCR se llevó a cabo en un volumen de 10 µl que contenía 10 ng de ADN, 50 mM KCl, 0,1mM dNTP y 0,11mM de cada cebador. Las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, otros aditivos y las condiciones de temperatura se ajustaron de acuerdo con las secuencias de los cebadores. Los productos de amplificación se purificaron con Exosap (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para retirar el excedente de cebador. Para la secuenciación se empleó el kit Dideoxy terminator (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Austin, TX, USA) combinado con los cebadores forward y reverse en reacciones independientes. Los productos de secuenciación se precipitaron con etanol y se analizaron en un secuenciador capilar (Abi Prism 3130xl Genetic Analyzer).

#### 2.2 Análisis de datos obtenidos.

Los datos secuenciados fueron analizados usando el software Genious Pro 5.6.5 partiendo como referencia con las secuencias de la base de datos genética NCBI, TERT (cr 5: 1,295,071 – 1,295,521, hg19 GRCH37), BRAF (NG\_007873.2) and NRAS (NG\_007572.1).

**ANEXO 2: Aprobación por comité de ética de la Fundación IVO**



Profesor Beltrán Báguena, 8  
46009 – VALENCIA  
Tfno.: 96 111 40 00  
Fax: 96 111 43 42

**DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

**Título:** CARACTERIZACIÓN DE LOS MELANOMAS CON MUTACIONES EN EL PROMOTOR DE TERT

**Investigador:** Virginia Sanz Motilva

El Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología en su reunión del **29/03/2017** tras la evaluación de la propuesta del promotor relativa al estudio especificado, y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del producto en relación con los objetivos del estudio.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Que se han evaluado las compensaciones económicas previstas (cuando las haya) y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.
- Que se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho estudio en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

Lo que firmo 30 de Marzo de 2017.

Dr. Carlos J. Andrés Blasco  
Secretario CEIC  
Fundación Instituto Valenciano de Oncología

### **ANEXO 3: Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación obtenidas en el curso de procedimientos quirúrgicos, terapéuticos o diagnósticos.**



Biobanco de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología  
C/Profesor Beltrán Bágüena,8  
46009-VALENCIA  
Tfno: 96 111 46 41 Fax: 96 111 43 41

RED VALENCIANA DE BIOBANCOS  
BIOBANCO DE LA FUNDACIÓN INSTITUTO VALENCIANO DE  
ONCOLOGÍA (V.1)

#### **Consentimiento Informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación obtenidas en el curso de procedimientos quirúrgicos, terapéuticos o diagnósticos.**

##### 1. - Identificación y descripción del procedimiento

Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido se podrán tomar muestras de sus tejidos, sangre, así como fluidos (orina, esputo, saliva, etc) o microorganismos. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente cualquier muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a la que va a ser sometido a un biobanco de muestras biológicas, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras biológicas excedentes podrán ser utilizados en proyectos de investigación biomédica que previamente sean aprobados por los comités externos, ético y científico, a los que está adscrito el biobanco.

Las muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

##### 2.- Objetivo

La finalidad del biobanco es recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y de nuevas medicinas para tratarlas.

##### 3.- Condiciones de la donación

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes que tienen su misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales, pero los costes de obtención, conservación y envío de las muestras se repercutirán, sin ánimo de lucro, a quienes las utilicen.

La donación de muestras no impedirá que Usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran.

Debe saber que será prioritario el uso diagnóstico de la muestra que dona y que se garantizará un remanente de las muestras para este fin.

##### 4.- Consecuencias previsibles de su realización

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, tiene a su disposición en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud.

## ANEXO 4: Consentimiento informado de todos los pacientes que participaron en los estudios .



Profesor Beltrán Bâguena, 8  
46009 – VALENCIA  
Tfno.: 96 111 40 00  
Fax: 96 111 43 41

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO DE UTILIDAD CLÍNICA  
HISTORIA CLÍNICA N°**

D./D<sup>a</sup>

como interesado/paciente (táchese lo que no proceda), con fecha de nacimiento , con domicilio en y D.N.I. n°

**DECLARO:**

Que el Dr. , el interlocutor principal del procedimiento con el equipo asistencial (según art. 10.7 LG.S.), me ha explicado que el cáncer es una enfermedad genética, entendiéndolo como tal a que se producen alteraciones a nivel genético que son las responsables de que un tumor se desarrolle y que responda a determinados fármacos. También se me ha informado de que podemos ser portadores de variantes genéticas que pueden predisponer al desarrollo del cáncer o condicionar la respuesta al tratamiento/s a los que voy a ser sometido/a.

**1.- Identificación y descripción del procedimiento.**

El procedimiento que se le propone, y del que se le informa verbalmente, consistirá en la realización un/unos análisis genético/s a partir del tejido excedente del proceso diagnóstico histopatológico y/o a partir de una muestra de sangre para detectar la presencia, ausencia o variantes de uno o varios segmentos de material genético, pudiendo incluir pruebas indirectas para la detección de productos génicos o metabolitos específicos indicativos de cambios genéticos determinados.

**2. Finalidad del análisis genético**

La finalidad de todos los análisis que se le proponen, así como aquellos que se le pudieran hacer en un futuro, es la correcta caracterización/diagnóstico del cáncer que padece y la optimización del manejo clínico de su enfermedad.

Debe saber, en cualquier caso, que se le informará verbalmente de los resultados de los mismos.

**3. Lugar de realización de análisis y destino de la muestra al término del mismo**

Las muestras destinadas al análisis genético, incluyendo las pruebas indirectas para la detección de productos génicos o metabolitos específicos indicativos de cambios genéticos determinados, se realizarán en los distintos laboratorios acreditados para tal fin de la institución que está tratando su enfermedad: anatomía patológica, análisis clínicos, hematología, microbiología, genética y biología molecular.

Las muestras, una vez procesadas, se almacenarán en el Biobanco de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología durante el tiempo necesario para realizar todo el proceso de análisis descrito y a continuación serán destruidas.

En caso de que se estime la conveniencia de otros usos, se requerirá su consentimiento para los mismos.

En el caso en el que los análisis genéticos se deban hacer fuera de la institución que le está prestando asistencia, sus datos de identificación personales serán debidamente disociados.

**4. Personas que tendrán acceso a los resultados de los análisis**

Los datos resultantes de los análisis se almacenarán en su historia clínica. Los profesionales sanitarios del centro tendrán acceso a los datos que consten en su historia clínica en tanto sea pertinente para la asistencia que le presten. El personal que acceda a los datos genéticos en el ejercicio de sus funciones quedará sujeto al deber de secreto de forma permanente.

**4 bis. Protección de datos**

Ha de saber que la información sobre sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria aplicable.

Los datos genéticos de carácter personal se conservarán durante un periodo mínimo de 5 años, tras los cuales podrá solicitar su cancelación.

Para solicitar la cancelación deberá hacerlo por escrito y dirigirse a la dirección médica del centro que trató su enfermedad.



## ANEXO 5: Variables recogidas en la base de datos de MM del IVO.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE Y CODIFICACIÓN
Número de identificación del melanoma a estudio	Texto libre
Número de historia	Texto libre
Hospital externo que envía al paciente	Texto libre
Médico que hace la primera visita	Texto libre
Número del SIP	Texto libre
Primer apellido	Texto libre
Segundo apellido	Texto libre
Fecha en la que le paciente es visto por primera vez en el Servicio de Dermatología del Hospital	Texto libre
Fecha en la que se realiza el diagnóstico histológico	Texto libre
Fecha del tratamiento definitivo (cirugía, radioterapia, quimioterapia)	Texto libre
Primera recaída tras el diagnóstico inicial	Sí/No
Fecha de la recaída	Día/Mes/Año
Última fecha en la que se tiene constancia de que el paciente está vivo	Día/Mes/Año
Paciente del que no se sabe de su evolución durante más de un año	Sí/No
Paciente fallecido (sea por la causa que sea)	Sí/No
Fallecimiento por el melanoma	Sí/No
Fallecimiento por otras causas	Sí/No
Fecha de la muerte en el caso de que haya sido por su melanoma	Día/Mes/Año
Fecha de la muerte en el caso de que haya sido por otras causas diferentes a su melanoma	Día/Mes/Año
Edad en que se le extirpó el melanoma	Texto libre
Fecha de nacimiento	Día/Mes/Año
Domicilio	Texto libre
Ciudad	Texto libre
Lugar de nacimiento	Comunidad Valenciana/ Otra comunidad/ Otro país/ Sin especificar

CAPÍTULO 12

<b>Teléfono</b>	Texto libre
<b>Email</b>	Texto libre
<b>Peso</b>	Texto libre
<b>Altura</b>	Texto libre
<b>Profesión</b>	Texto libre
<b>Estudios</b>	Ninguno/ Menos de 14 años/ Hasta 14 años/ Hasta 16 años/ Hasta 18 años/ Estudios medios/ Estudios superiores/ Sin especificar
<b>Fototipo</b>	Según Clasificación de Fitzpatrick/ Sin especificar
<b>Color del pelo</b>	Negro/ Castaño oscuro/ Castaño claro/ Rubio/ Pelirrojo/ Sin especificar
<b>Número de quemaduras con ampollas o dolor de al menos 2 días</b>	Número
<b>Quemaduras leves</b>	Sí/No / Sin especificar
<b>Quemaduras en el área del melanoma</b>	No/ Leves/ Intensas/ No aplicable (mucosas, ocular)/ Sin especificar
<b>Exposición solar crónica</b>	Sí/No / Sin especificar
<b>Profesión según exposición al sol</b>	No expuesta al sol/ Expuesta al sol/ Sin especificar
<b>Años de profesión al sol</b>	Número de años de exposición al sol
<b>Exposición intermitente al sol (exposición solar ocio o estival)</b>	Sí/No / Sin especificar
<b>Exposición intermitente</b>	Estival/ Actividades aire libre/ Sin especificar
<b>Rayos UVA</b>	Sí/No / Sin especificar
<b>Número de sesiones de Rayos UVA</b>	Número aproximado de sesiones
<b>Edad a la que empezó la exposición a las lámparas UVA</b>	Edad en años/ No procede/ Sin especificar
<b>Número de cigarrillos al día</b>	No/ <10/ 10-20/ >20/ Sin especificar
<b>Años de consumo de tabaco</b>	No procede/ Sin especificar
<b>Menopausia</b>	Sí/No / No procede/ Sin especificar
<b>Anticonceptivos</b>	No/ Sí, alguna vez pero no en el diagnóstico/ Sí, en el momento del diagnóstico/ No procede/ Sin especificar

## ANEXOS

Meses transcurridos desde la finalización del uso de anticonceptivos orales y el diagnóstico de melanoma maligno	Número de meses
Embarazo	No/ En el diagnóstico/ Previos/ Posterior/ No procede/ Sin especificar
Embarazos previos	Número
Diagnóstico durante el embarazo	Sí/No
Embarazos posteriores al diagnóstico	Número
Efélides en la infancia	Sí/No
Efélides en la cara	Número, acorde con "Freckling chart de Vancouver"
Efélides en los brazos	Número, acorde con "Freckling chart de Vancouver"
Efélides en el tronco	Número, acorde con "Freckling chart de Vancouver"
Lentigos	Sí/No
Queratosis actínicas	Sí/No
Léntigos en el área del melanoma	Sí/No
Aparición de un segundo tumor	Sí/No
Tipo de segundo tumor	Texto libre
Carcinoma espinocelular previos y tras el diagnóstico	Sí/No
Carcinoma basocelular previos y tras el diagnóstico	Sí/No
Queratosis seborreicas	Sí/No
Nevus congénito	Ninguno/ Pequeño/ Mediano/ Gigante/ Sin especificar
Nevus melanocíticos comunes de mayor de 2 mm	Número/ Sin especificar
Patrón de nevus	No tiene casi/ Lentiginoso/ Intradérmico/ Mixto: lentiginoso más intradérmico/ Sin especificar
Número de nevus en el área del melanoma (se considera como área las zonas definidas por la regla de los 9)	Número
Nevus atípicos	Número
Nevus displásicos según estudio histológico	Número
Melanoma múltiple	Sí/No
Número de melanomas	Número
Número de familiares afectados con melanoma	Número
Grado de parentesco del familiar con melanoma	Segundo grado/ Primer grado/ No procede/ Sin especificar

CAPÍTULO 12

<b>Miembro de la familiar primer y segundo grado con cáncer de páncreas</b>	Sí/No / Adoptado/ Sin especificar
<b>Miembro de la familia de primer grado con algún tipo de cáncer</b>	Sí/No / Adoptado/ Sin especificar
<b>Miembro de la familia segundo grado con algún tipo de cáncer</b>	Sí/No / Adoptado/ Sin especificar
<b>Laminilla disponible</b>	Sí/No
<b>Bloque disponible</b>	Sí/No
<b>Motivo de consulta</b>	Autoexploración y observación de una lesión rara/ Hallazgo exploratorio/ Síntomas (aumento del volumen, cambio de coloración, sangrado)/ Detección en el programa de seguimiento de nevus-screening/ Observación por una tercera persona/ Desconocido
<b>Meses desde que percibió algún cambio en la lesión</b>	Número
<b>Número Meses desde que el paciente es consciente que tiene la lesión</b>	Número
<b>Cambio en el volumen</b>	Sí/No / No lo percibió/ Sin especificar
<b>Tiempo desde la percepción del cambio de volumen hasta la extirpación</b>	<1mes/ 1-3 meses/ 4-6 meses/ 7-12 meses/ >1 año/ No lo sabe/ Sin especificar
<b>Sangrado</b>	Sí/No
<b>Si existe foto clínica en la historia del paciente</b>	Sí/No
<b>Localización</b>	Texto
<b>Localización en función de la exposición al sol</b>	Área oculta al sol siempre/ Área expuesta al sol sólo en verano/ Área expuesta todo el año/ No procede/ Sin especificar
<b>Localización en función de la visibilidad por el paciente</b>	Visible por el paciente/ Visible para conviviente íntimo/ Oculta para ambos/ No procede
<b>Exéresis</b>	Exéresis completa/ Biopsia incisional/ Rebanado/ No procede
<b>Márgenes</b>	Negativos/ Laterales afectos/ Profundidad afecta/ Laterales y profundidad afectados/ No procede
<b>Tipo histológico</b>	LMM/ SMM/ MN/ Otros-inclasificable/ No procede
<b>Ampliación del melanoma</b>	Número
<b>Fase de crecimiento</b>	Horizontal/ Vertical/ No procede

## ANEXOS

<b>Breslow</b>	Número
<b>Clark</b>	Número
<b>Ulceración</b>	Sí/No
<b>Reacción linfocitaria</b>	Nula/ Escasa o moderada/ Intensa/ No procede/ Sin especificar
<b>Disposición del infiltrado</b>	Peritumoral/ Intratumoral/ No procede/ Sin especificar
<b>Infiltrado peritumoral</b>	Ausente/ Discontinuo/ Denso/ No procede/ Sin especificar
<b>Satelitosis microscópica</b>	Sí/No
<b>Número de mitosis en 1 mm<sup>2</sup></b>	Número
<b>Regresión</b>	Sí/No
<b>Invasión vascular</b>	Sí/No
<b>Restos de nevus preexistente</b>	Sí/No
<b>Tipo de lesión previa histológica</b>	No/ Nevus displásico/ Nevus congénito/ Nevus común/ Nevus azul/ Nevus Spilus/ Otros/ No procede
<b>Invasión perineural</b>	Sí/No
<b>Tipo celular</b>	Epiteloides/ Fusiforme/ Nevoide/ Balonzantes/ Atípicos/ Otros/ No procede
<b>Elastosis histológica</b>	Sí/No
<b>Elastosis actínica</b>	Ausente/ Leve/ Moderada/ Intensa/ No valorable/ Sin especificar
<b>Ganglio centinela</b>	Sí/No
<b>Biopsia del ganglio centinela</b>	Sí/No
<b>Número de ganglios centinelas afectados</b>	Número
<b>Metástasis</b>	Sí/ No
<b>Tamaño del mayor foco metastásico</b>	Número
<b>Linfadenectomía</b>	No/ Electiva/ Profiláctica/ Terapéutica
<b>Territorios de los que se ha hecho la linfadenectomía</b>	Texto libre
<b>Adenopatías palpables</b>	Sí/No
<b>Ganglios extirpados</b>	Número
<b>Número de ganglios positivos sin contar con el ganglio centinela</b>	Número

CAPÍTULO 12

<b>Número de ganglios con afectación capsular</b>	Número
<b>Adenopatías clínicas palpables/detectadas por imagen locorregionales previas al ganglio centinela</b>	Número
<b>Estudio PET estadificación</b>	Sí/No
<b>Estadio</b>	Melanoma in situ/ Localizado/ Metástasis ganglionares/ Metástasis sistémicas/ Sin especificar
<b>Realización de estudio mutación BRAF</b>	Sí/No/No realizada
<b>Realización de estudio mutación NRAS</b>	Sí/No/No realizada
<b>Realización de estudio mutación MC1R</b>	Sí/No/No realizada
<b>Realización de estudio mutación TERT</b>	Sí/No/No realizada
<b>Realización de estudio polimorfismos</b>	Sí/No/No realizada

**ANEXO 6: Cuadernillo en papel con la definición de variables del estudio, su descripción y su clasificación para poder consultarlo durante la evaluación de los casos.**

6.1 Cuaderno primera ronda (ESTUDIO 1)

**1) Extensión Pagetoide**

- Independiente de si lo están de forma aislada o en nidos
- Grados:
  - 0: Practicamente todos los melanocitos en la unión dermoepidérmica.
  - 1: La mayoría de los melanocitos (75-100%) en la unión dermoepidérmica y solo algunos más arriba en la epidermis.
  - 2: Misma proporción de melanocitos en la unión dermoepidérmica que en estratos epidérmicos.
  - 3: Más del 50% en estratos epidérmicos por encima de la unión dermoepidérmica.

Scatter 0  
Scatter 1  
Scatter 2  
Scatter 3

**2) Formación de nidos (melanocitos intraepidérmicos)**

- Compuestos por 5 o más células independientemente de si están localizados en la membrana basal o en estratos epidérmicos altos.
- Grados:
  - 0: Melanocitos aislados o raramente formando pequeños nidos.
  - 1: Menos de 25% de nidos intraepidérmicos
  - 2: 25-50% de los melanocitos en nidos
  - 3: Más del 50% de los melanocitos intraepidérmicos en nidos

Nesting 0  
Nesting 1  
Nesting 2  
Nesting 3

**3) Pigmentación de melanocitos**

Acumulación de melamina en los melanocitos medido en escala de 5 puntos y usando objetivos de x20 y x40. La pigmentación del citoplasma se compara con la de los núcleos. Quedan excluidos los melanófagos.

Pigmentación máxima en cualquier lugar del tumor.

- Grados:
  - 0: Ausente, incluso a gran aumento.
  - 1: Débil. Apenas visible pequeño aumento. A gran aumento, melanocitos con pigmento difuso débil o pocos gránulos de pigmento.
  - 2: Moderada. Pigmentación visible a pequeño aumento con citoplasma más claro que el núcleo teñido de hematoxilina.
  - 3: Intensa. Fácilmente visible a bajo aumento con una intensidad de pigmento citoplásmico parecida a la del núcleo.
  - 4: Muy intensa. El citoplasma está tan pigmentado que es difícil diferenciarlo del núcleo.

Absent      Faint      Moderate

High      Very high

**4) Patrón de crecimiento**

En aquellos melanomas invasivos se describe el tipo de infiltración. De forma que si crece empujando el tejido sano periférico de forma nodular se considera expansivo y se crece formando tractos espiculados que invaden el tejido adyacente se conoce como infiltrativo. Estos patrones pueden ser mixtos con distintas proporciones de cada patrón.

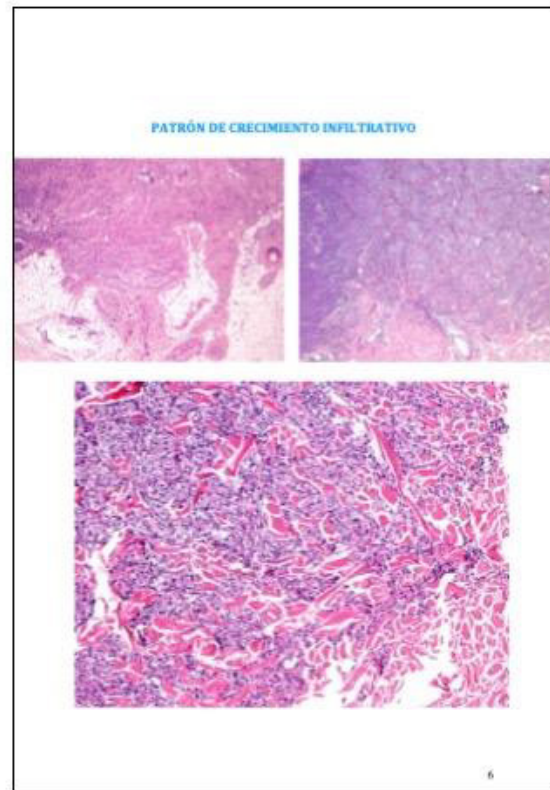
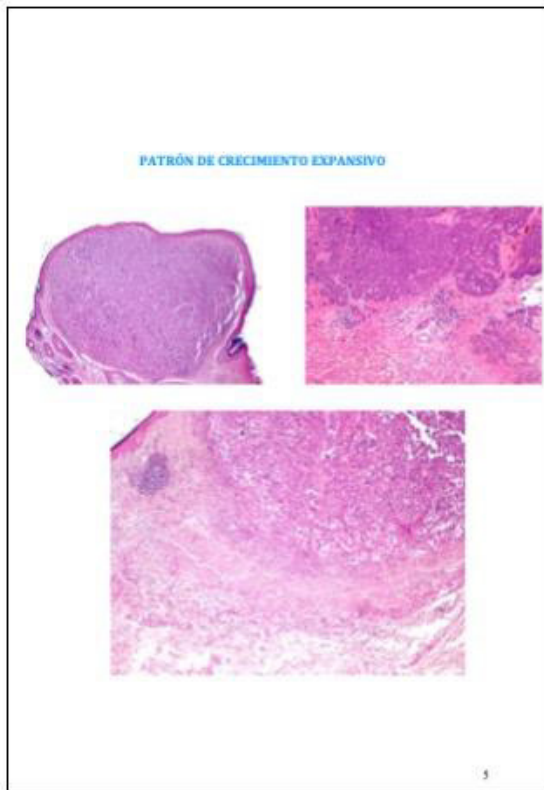
0: No hay predominio de ningún patrón. Presenta áreas de patrón expansivo en el 50% de la superficie del tumor y áreas de crecimiento infiltrativo en el 50% de la superficie del tumor.

1: Predominio del patrón de crecimiento expansivo. Más del 50% del tumor presenta este patrón.

2: Predominio del patrón de crecimiento infiltrativo. Más del 50% del tumor presenta este patrón.

Expansivo

Infiltrativo



**5) Contorno epidérmico**  
El contorno de la epidermis correspondiente a la zona de crecimiento radial del tumor comparada con la de la piel adyacente normal.

Tipos según predominio:

- 0: Atrofia, epidermis claramente adelgazada con aplanamiento de las crestas epidérmicas.
- 1: Adelgazamiento, epidermis adelgazada pero con atenuación parcial de las crestas epidérmicas.
- 2: Normal, parecida a la epidermis adyacente
- 3: Engrosamiento, epidermis engrosada con alargamiento de las crestas epidérmicas hasta x2 el grosor de la epidermis adyacente.
- 4: Hiperplasia, epidermis engrosada más de x2 el grosor de la epidermis adyacente

		Atrófica
		Thinned
		Normal
		Thickened
		Hyperplásica

7

- 5: No hay predominio de ningún subtipo, al menos dos subtipos distribuidos al 50%

**6) Delimitación Lateral**  
Evaluación de la zona de transición de la porción de crecimiento intraepidérmico del melanoma con la piel normal en la periferia. El área con la transición gradual más marcada era la que se medía en tres grados.

Grados:

- 0: Discontinua, áreas de epidermis normal alternando con nidos de tumor.
- 1: Gradual pero continua, disminución progresiva del número de melanocitos, siendo difícil detectar la transición del tumor, en un área de 1 o 2 crestas epidérmicas o 0.1mm.
- 2: Abrupta, transición brusca de piel normal a tumoral, fácilmente detectable en 1 o 2 crestas epidérmicas o 0.1 mm.

**7) Elastosis solar**  
Presencia de fibras elásticas (H&E, 10x-20x) en las áreas de piel sana en torno al melanoma.

8

Grados:

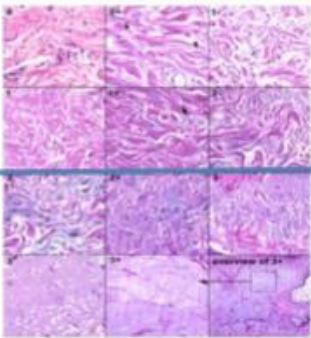
- 0: Ausencia de fibras elásticas.
- 1: Escasa, fibras elásticas aisladas de forma individual, entre los haces de colágeno.
- 2: Moderada. Fibras elásticas dispersas pero en conglomerados más que de forma individual
- 3: Marcada. Fibras elásticas en depósitos amorfos de color gris-azulado con pérdida de la estructura fibrilar

**8) Tipos elastosis CSD:** según Landi MT (Science 2006) (*chronic sun induced damage*). De este modo se simplifica el sistema de clasificación de los 11 grados en 2 grupos.

0: Non-csd: Ausencia de elastosis o elastosis de escasa a moderada. Fibras principalmente aisladas y pocas formando conglomerados. (De 0 a 2-)

1: csd: marcada elastosis solar (De 2 a 3+). Mayor densidad de depósitos de fibras elásticas, formando conglomerados incluso masas amorfas.

9

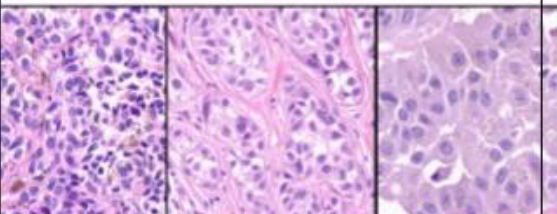


**9) Tamaño y forma de las células**  
Evaluación del tamaño y morfología en la porción más celular del tumor con una lente de 20x.

- Tamaño de la celularidad predominante:
  - 1: pequeña, menor a 8  $\mu\text{m}$
  - 2: mediana, entre 8 y 10  $\mu\text{m}$

10

- 3 grande, más de 10  $\mu\text{m}$

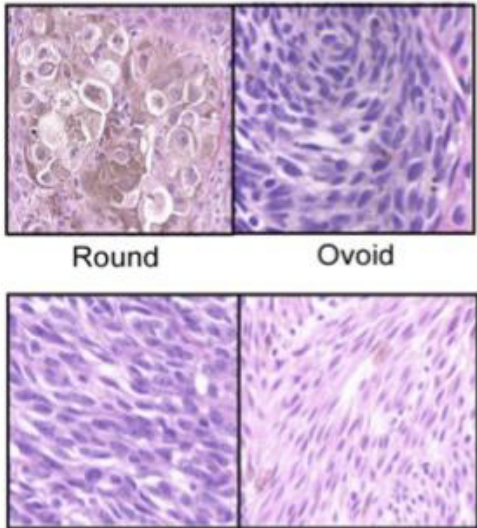


Small
Medium
Large

**10) Morfología celular:**  
Tipos según predominio:

- 0: redondeada, diámetro largo y corto similar.
- 1: ovoide, diámetro largo aproximadamente 1/3 mayor que el corto.
- 2: elongada, diámetro largo de 1/3 a x2 veces mayor que el corto.
- 3: fusiforme, diámetro largo x2 veces mayor que el corto
- 4: no hay predominio de ningún subtipo, al menos 2 subtipos distribuidos al 50%

11



Round
Ovoid

Elongated
Spindled

**10) Ulceración**

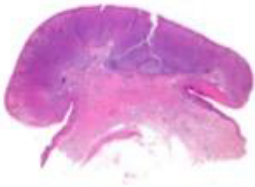
12

Pérdida completa de la epidermis, con respuesta inflamatoria (fibrina, neutrófilos...) y adelgazamiento, aplanamiento o hiperplasia de la epidermis adyacente.  
 - 0: Ausencia de ulceración  
 - 1: Presencia de ulceración

**11) Tipo de ulceración**  
 - 0: No existe ulceración  
 - 1: Expansiva  
 - 2: Infiltrativa

**12) Morfología polipoide**  
 - 0: No  
 - 1: Sí

**MELANOMA POLIPOIDE**



**13) Regresión**  
 Se define como aquella característica por la cual de forma espontánea la porción dérmica del melanoma disminuye o desaparece, y es sustituida progresivamente por un estroma fibroso, sin melanocitos tumorales o escasos, pero con melanófagos, linfocitos y vasos neoformados.  
 - 0: No regresión  
 - 1: Regresión menor al 50%  
 - 2: Regresión mayor al 50%

13

**14) Necrosis**  
 - 0: Ausencia  
 - 1: Presencia

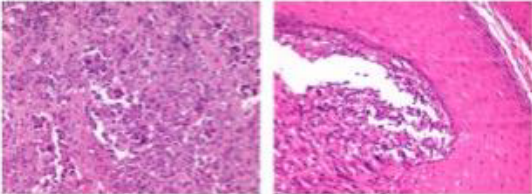


**NECROSIS**

**15) Acanthosis o patrón discohesivo**  
 - 0: Ausencia  
 - 1: Presencia

14

**ACANTÓLISIS**



15

6.2 Cuadernillo segunda ronda (ESTUDIO 1)

**1) Extensión Pagetoide**

- Independiente de si lo están de forma aislada o en nidos
- Grados:
  - 0: Practicamente todos los melanocitos en la unión dermoepidérmica. La mayoría de los melanocitos (75-100%) en la unión dermoepidérmica y menos del 25% más arriba en la epidermis.
  - 1. Franca extensión pagetoide: >25% Melanocitos suprabasales

**0**

**1**

**2) Formación de nidos (melanocitos intraepidérmicos)**

- Compuestos por 5 o más células independientemente de si están localizados en la membrana basal o en estratos epidérmicos altos.
- Grados:
  - 0: Melanocitos aislados o raramente formando pequeños nidos. Menos de 25% de nidos intraepidérmicos
  - 1: >25% de los melanocitos en nidos

**0**

**1**

**3) Pigmentación de melanocitos**

Acumulación de melanina en los melanocitos medido en escala de 5 puntos y usado objetivos de x20 y x40. La pigmentación del citoplasma se compara con la de los núcleos. Quedan excluidos los melanóforos. Pigmentación máxima en cualquier lugar del tumor.

- Grados:
  - 0: Ausente o débil. Apenas visible pequeño aumento. A gran aumento melanocitos con pigmento difuso débil o pocos gránulos de pigmento.
  - 1: Moderada. Pigmentación visible a pequeño aumento con citoplasma más claro que el núcleo teñido de hematoxilina.
  - 2: Intensa o muy intensa. Fácilmente visible a bajo aumento con una intensidad de pigmento citoplásmico parecida o superior a la del núcleo.

**0**

**1**

**2**

**4) Distribución del pigmento**

- 0) Ausente
- 1) FOCAL Menos de 20%
- 2) Más del 20%

**5) Patrón de crecimiento**

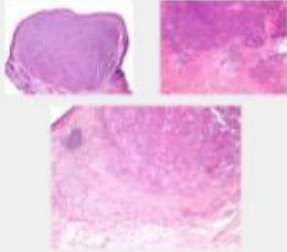
En aquellos melanomas invasivos se describe el tipo de infiltración. SOLO EN AQUELLOS CON FASE DE CRECIMIENTO VERTICAL. PANORÁMICA O PEQUEÑO AUMENTO. De forma que si crecer empujando el tejido sano periférico de forma nodular se considera expansivo y se crece formando trastes espiculados que invaden el tejido adyacente se conoce como infiltrativo.

- 0: Predominio del patrón de crecimiento expansivo. Más del 50% del tumor presenta este patrón.
- 1: Predominio del patrón de crecimiento infiltrativo. Más del 50% del tumor presenta este patrón.

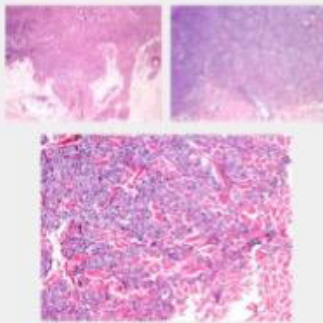
Expansivo

Infiltrativo

Patrón de crecimiento expansivo



Patrón de crecimiento infiltrativo



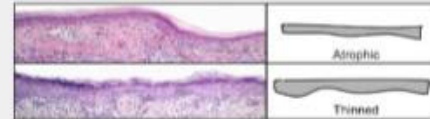
6) Grosor epidérmico

El contorno de la epidermis correspondiente a la zona de crecimiento radial del tumor comparada con la de la piel adyacente normal.

Tipos según predominio:

- 0: Atrófica o adelgazada: epidermis claramente adelgazada con aplanamiento de las crestas epidérmicas, epidermis adelgazada pero con atenuación parcial de las crestas epidérmicas
- 1: Normal, parecida a la epidermis adyacente
- 2: Engrosamiento, epidermis engrosada con alargamiento de las crestas epidérmicas hasta x2 el grosor de la epidermis adyacente. Hiperplasia, epidermis engrosada más de x2 el grosor de la epidermis adyacente

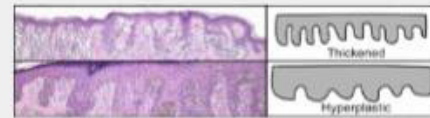
0



1



2

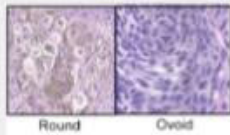


7) Morfología celular:

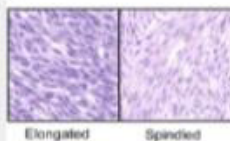
Tipos según predominio:

- 0: Redonda u ovoide: redondeada, diámetro largo y corto similar/ovoid, diámetro largo aproximadamente 1/3 mayor que el corto.
- 1: Elongada o fusiforme: elongada, diámetro largo de 1/3 a x2 veces mayor que el corto/fusiforme, diámetro largo x2 veces mayor que el corto
- 2: no hay predominio de ningún subtipo, al menos 2 subtipos distribuidos al 50%

0



1



8) Ulceración

Ausencia completa de la epidermis, con respuesta inflamatoria (fibrina, neutrófilos...) y adelgazamiento, aplanamiento o hiperplasia de la epidermis adyacente.

- 0: Ausencia de ulceración
- 1: Presencia de ulceración

9) Tipo de ulceración

- 0: No existe ulceración
- 1: Expansiva
- 2: Infiltrativa

10) Regresión

Se define como aquella característica por la cual de forma espontánea la porción dérmica del melanoma disminuye o desaparece, y es sustituida progresivamente por un estroma fibroso, sin melanocitos tumorales o escasos, pero con melanófagos, linfocitos y vasos neovascularizados.

- 0: No regresión
- 1: Regresión menor al 50%
- 2: Regresión mayor al 50%

11) Necrosis

- 0: Ausencia
- 1: Presencia

Necrosis



**12j Acantósis**

- 0j Ausencia
- 1j Presencia

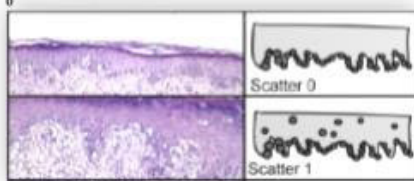


6.3 Cuadernillo ESTUDIO 2


**1) Extensión Pagetoide**  
 - Independiente de si lo están de forma aislada o en nidos  
 - Grados:

- 0: Prácticamente todos los melanocitos en la unión dermoepidérmica. La mayoría de los melanocitos (75-100%) en la unión dermoepidérmica y menos del 25% más arriba en la epidermis.
- 1: Franca extensión pagetoide: >25% Melanocitos suprabasales

**0**



**1**

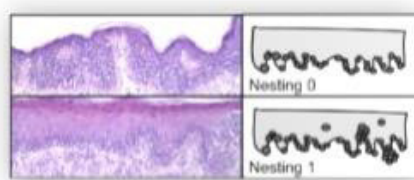


**2) Formación de nidos (melanocitos intraepidérmicos)**  
 - Compuestos por 5 o más células independientemente de si están localizados en la membrana basal o en estratos epidérmicos altos.  
 - Grados:

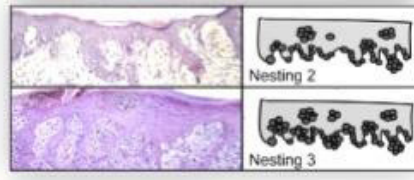
1

- 0: Melanocitos aislados o raramente formando pequeños nidos. Menos de 25% de nidos intraepidérmicos
- 1: >25% de los melanocitos en nidos

**0**



**1**




**3) Pigmentación de melanocitos**  
 Acumulación de melanina en los melanocitos medido en escala de 2 puntos y usando objetivos de x20 y x40.  
 La pigmentación del citoplasma se compara con la de los núcleos. Quedan excluidos los melanófagos.  
 Pigmentación máxima en cualquier lugar del tumor.  
 - Grados:

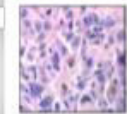
1

- 0: Ausente
- 1: Débil. Apenas visible pequeño aumento. A gran aumento, melanocitos con pigmento difuso débil o pocos gránulos de pigmento.
- 2: Moderada o intensa. Pigmentación visible a pequeño aumento con citoplasma más clara que el núcleo teñido de hematoxilina o fácilmente visible a bajo aumento con una intensidad de pigmento citoplásmico parecida o superior a la del núcleo.

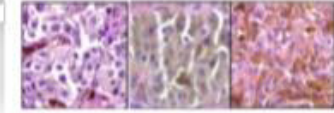
**0**



**1**



**2**



**4) Distribución del pigmento**

0) Ausente  
 1) Focal. Menos de 20%

3

2) Extensa. Más del 20%

**5) Patrón de crecimiento**  
 En aquellos melanomas invasivos se describe el tipo de infiltración. SOLO EN AQUELLOS CON FASE DE CRECIMIENTO VERTICAL. PANORÁMICA O PEQUEÑO AUMENTO. De forma que si crece empujando el tejido sano periférico de forma nodular se considera expansivo y se crece formando tractos espiculados que invaden el tejido adyacente se conoce como infiltrativo.

0: Predominio del patrón de crecimiento expansivo. Más del 50% del tumor presenta este patrón.  
 1: Predominio del patrón de crecimiento infiltrativo. Más del 50% del tumor presenta este patrón.



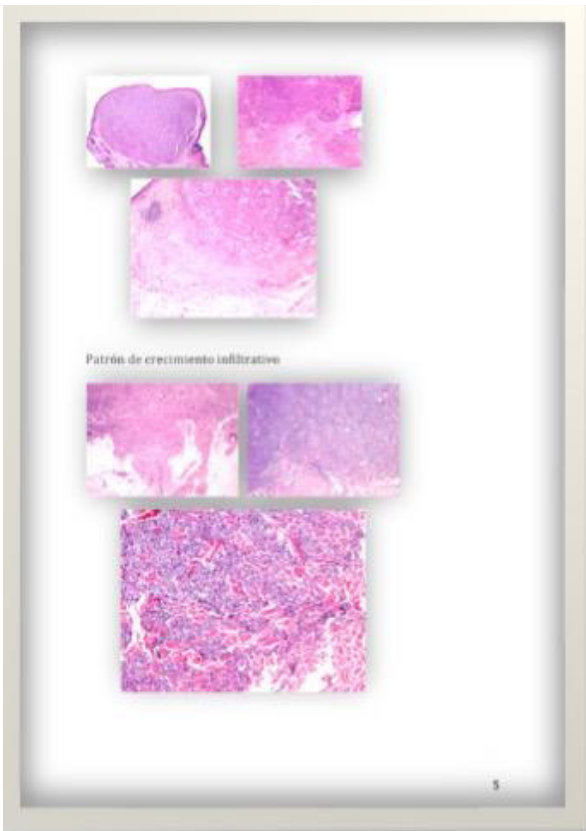
Expansivo



Infiltrativo

Patrón de crecimiento expansivo

4



5

**6) Tipo elastosis CSD (2 grados):** según Landi MT [Science 2006] (chronic sun induced damage). De este modo se simplifica el sistema de clasificación de los 11 grados en 2 grupos.

0: Non-CSD: Ausencia de elastosis o elastosis de escasa a moderada. Fibras principalmente aisladas y pocas formando conglomerados. (De 0 a 2-)

1: CSD: marcada elastosis solar (De 2 a 3+). Mayor densidad de depósitos de fibras elásticas, formando conglomerados incluso masas amorfas.

**7) Tipo elastosis CSD (3 grados):**

0: Ausente (0)

1: Débil, Non-CSD (0+ a 2-)

2: Marcada, CSD (2 a 3+)

**8) Grosor epidérmico**  
El contorno de la epidermis correspondiente a la zona de crecimiento radial del tumor comparada con la de la piel adyacente normal.

Tipos según predominio:

- 0: Atrófica o adelgazada: epidermis claramente adelgazada con aplanamiento de las crestas epidérmicas, epidermis adelgazada pero con atenuación parcial de las crestas epidérmicas

6

- 1: Normal, parecida a la epidermis adyacente

- 2: Engrosamiento, epidermis engrosada con alargamiento de las crestas epidérmicas hasta x2 el grosor de la epidermis adyacente. Hiperplasia, epidermis engrosada más de x2 el grosor de la epidermis adyacente

0

1

2

**9) Morfología celular:**  
Tipos según predominio:

- 0: Redonda u ovoide: redondeada, diámetro largo y corto similar/ovoide, diámetro largo aproximadamente 1/3 mayor que el corto.
- 1: Elongada o fusiforme: elongada, diámetro largo de 1/3 a x2 veces mayor que el corto/fusiforme, diámetro largo x2 veces mayor que el corto.

7

- 2: no hay predominio de ningún subtipo, al menos 2 subtipos distribuidos al 50%

0

1

**10) Ulceración**  
Ausencia completa de la epidermis, con respuesta inflamatoria (fibrina, neutrófilos...) y adelgazamiento, aplanamiento o hiperplasia de la epidermis adyacente.

- 0: Ausencia de ulceración
- 1: Presencia de ulceración

**11) Tipo de ulceración**

- 0: No existe ulceración
- 1: Expansiva
- 2: Infiltrativa

8

CAPÍTULO 12

**ANEXO 7: Hoja de recogida de datos de cada caso.**

7.1 Hoja de recogida de datos primera ronda (ESTUDIO 1)

Extensión Pagetoide	0	1	2	3		
Nidos intraepidérmicos	0	1	2	3		
Pigmentación de los melanocitos	0	1	2	3	4	
Patrón de crecimiento	0		1	2		
Contorno epidérmico	0	1	2	3	4	5
Delimitación Lateral	0		1	2		
Elastosis solar	0	1	2	3		
Tipo de elastosis	0			1		
Morfología celular	0	1	2	3	4	
Ulceración	0			1		
Tipo de ulceración	0		1	2		
Morfología polipoide	0			1		
Regresión	0		1	2		
Necrosis	0			1		
Pseudoacantolisis	0			1		
Pleocitosis	0			1		

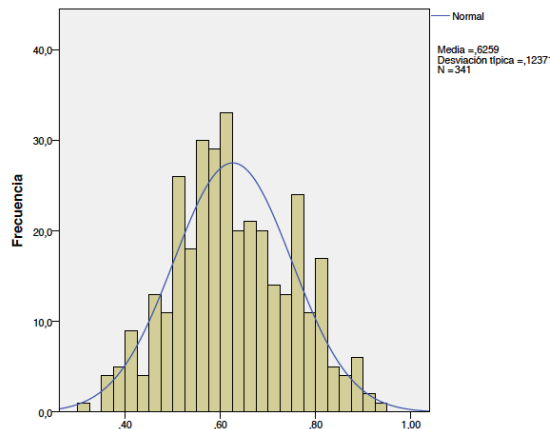
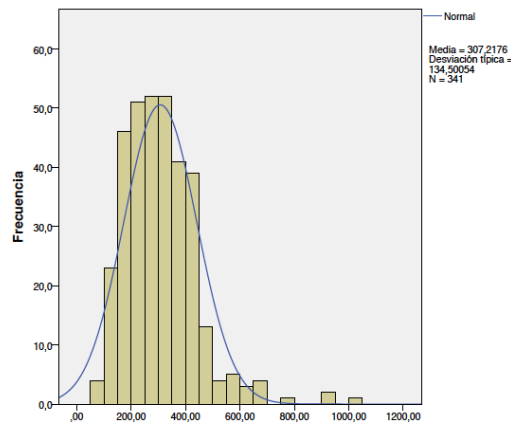
7.2 Hoja de recogida de datos segunda ronda (ESTUDIO 1)

Extensión pagetoide	0	1	
Nidos intraepidérmicos	0	1	
Pigmentación de los melanocitos	0	1	2
Distribución del pigmento	0	1	2
Patrón de crecimiento	0	1	2
Contorno epidérmico	0	1	2
Morfología celular	0	1	2
Ulceración	0		1
Tipo de ulceración	0	1	2
Regresión	0	1	<b>2</b>
Necrosis	0		<b>1</b>
Pseudoacantolisis	0		1

7.3 Hoja de recogida de datos ESTUDIO 2

Extensión pagetoide	0 ( $\leq 25\%$ )		1 ( $>25\%$ )	
Nidos intraepidérmicos	0 ( $\leq 25\%$ )		1 ( $>25\%$ )	
Pigmentación de los melanocitos	0 (Ausente o mínima)		1 (Moderada) (Pero más claro que el núcleo)	2 (Intensa) (Igual o más intenso que el núcleo)
Distribución del pigmento	0 (Ausente)		1 (Focal, $\leq 20\%$ )	2 (Extenso, $>20\%$ )
Patrón de crecimiento	0 (Sin predominio)		1 (Predominio exp)	2 (Predominio infilt)
Grosor epidérmico	0 (Atrofia o adelgazado)		1 (Normal)	2 (Engrosado o hiperplásico)
Elastosis solar	0 (Ausente)	1 (Escasa)	2 (Moderada)	3 (Marcada)
Tipo de elastosis	0 (Non-CSD; ausencia o escasa)		1 (CSD; acusada)	
Morfología celular	0 (Redondeada, ovoide)		1 (Elongada o fusiforme)	2 (Sin predominio)
Ulceración	0 (Ausencia)		1 (Presencia)	
Tipo de ulceración	0 (Ausente)		1 (Expansiva)	2 (Infiltrativa)
Morfología polipoide	0 (Ausente)		1 (Presente)	
Regresión	0 (Ausente)		1 (Menor al 50%)	2 (mayor al 50%)
Pseudoacantósis	0 (Ausente)		1 (Presente)	

**ANEXO 8: Gráficos de distribución normal de las variables cuantitativas continuas forma celular (cociente de diámetro menor y mayor) y superficie celular.**



Diferencia entre diámetro menor/mayor para forma celular

**ANEXO 6: Tablas con los resultados del estudio 2. Análisis de distribución de variables y estudio univariado.**

9.1 Diferencias en la distribución de variables según la presencia o ausencia de mutaciones en el promotor de TERT

Variable	Total		pTERT+		pTERT-		p
	N	%	N	%	N	%	
Extensión pagetoide					0		,092
No	154	45,8	75	51,0	79	41,8	
Sí	182	54,2	72	49,0	110	58,2	
Nidos							0,003
No	132	39	71	48,3	61	32,4	
Sí	203	60,6	76	51,7	127	67,6	
Pigmentación intensa							0,003
No	86	25,5	49	33,3	37	19,5	
Sí	251	74,5	98	66,7	153	80,5	
Distribución del pigmento							0,004
Ausente	68	20,3	41	28,1	27	14,3	
Focal	64	19,1	29	19,9	35	18,5	
Extensa	203	60,6	76	52,1	127	67,2	
Patrón de crecimiento							0,014
Expansivo	91	33,6	51	40,8	40	27,4	
Infiltrativo	180	66,4	74	59,2	106	72,6	
Morfología celular							0,364
Redonda/ovoide	317	94,3	136	93,2	181	95,3	
Alargada/fusiforme	13	3,9	8	5,5	5	2,6	
No hay predominio	6	1,8	2	1,4	4	2,1	
Ulceración							0,001
No	245	74,9	96	66,2	149	81,9	
Sí	82	25,1	49	33,8	33	18,1	
Regresión							0,737
Ausente	309	92,2	133	91,7	176	92,6	
Menor a 50%	14	4,2	6	4,1	8	4,2	
Mayor a 50%	12	3,6	6	4,1	6	3,2	
Elastosis							0,033
No CSD	304	91,3	129	87,8	175	94,1	
CSD	29	8,7	18	12,2	11	5,9	
Elastosis 3 cat							0,006
Ausencia	200	60,1	77	52,4	123	66,1	
No CSD	107	32,1	52	35,4	55	29,6	
CSD	26	7,8	18	12,2	8	4,3	
Acantolisis							0,036
No	279	82,8	115	78,2	164	86,3	
Sí	58	17,2	32	21,8	26	13,7	
Polipoide							0,001
No	299	90,1	120	83,9	179	94,7	
Sí	33	9,9	23	16,1	10	5,3	
Tipo histológico							<0,001
LMM	18	5,3	9	6,1	9	4,6	
MES	190	55,6	74	50,0	116	59,8	
MN	97	28,4	57	38,5	40	20,6	
MLA	27	7,9	0	0,0	27	13,9	
Otros sin clasificar	10	2,9	8	5,4	2	1,0	

ANEXOS

Breslow ≤2 mm	200	58,5	67	45,3	133	68,6	<0,001
>2 mm	142	41,5	81	54,7	61	31,4	
Nevus previo							0,311
No	264	77,6	118	80,3	146	75,6	
Sí	76	22,4	29	19,7	47	24,4	
Infiltrado linfocit. intratumoral							0,103
No	142	44,0	55	39,3	87	47,5	
“Non-brisk”	172	53,3	83	59,3	89	48,6	
“Brisk”	9	2,8	2	1,4	7	3,8	
Tasa mitosis							<0,001
0 mit/mm <sup>2</sup>	78	23,6	21	14,6	57	30,5	
1-5 mit/mm <sup>2</sup>	297	59,5	80	55,6	117	62,6	
>5 mit/mm <sup>2</sup>	56	16,9	43	29,9	13	7,0	
Satelitosis microscópica							0,271
No	324	95,3	137	93,8	187	96,4	
Si	16	4,7	9	6,2	7	3,6	
Invasión vascular							0,064
No	332	97,6	140	95,9	192	99,0	
Sí	8	2,4	6	4,1	2	1,0	
Invasión perineural							0,792
No	334	98,8	145	98,6	189	99,0	
Sí	4	1,2	2	1,4	2	1,0	

9.2 Diferencias en la distribución de variables según el perfil mutacional de BRAF y pTERT

Variable	Total		BRAF-/pTERT-		BRAF+/pTERT-		BRAF+/pTERT-		BRAF+/pTERT+		P
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Ext pagetoide											0,320
No	146	45,5	55	43,0	18	37,5	38	53,5	35	47,3	
Sí	175	54,5	73	57,0	30	62,5	33	36,5	39	52,7	
Nidos											0,170
No	125	39,1	38	29,9	18	37,5	37	52,1	32	43,2	
Sí	195	60,9	89	70,1	30	62,5	34	47,9	42	56,8	
Pigmentación Intensa											0,008
No	74	27,4	18	22,2	11	18,3	17	48,6	28	29,8	
Sí	196	72,6	63	77,8	49	81,7	18	51,4	66	70,2	
Distribución del pigmento											0,040
Ausente	66	20,6	21	16,4	5	10,4	24	33,8	16	21,9	
Focal	63	19,7	23	18,0	11	22,9	13	18,3	16	21,9	
Extenso	191	59,7	84	65,6	32	66,7	34	47,9	41	56,2	
Patrón de crecimiento											0,003
Expansivo	86	33,1	24	25,0	12	29,3	30	53,6	20	29,9	
Infiltrativo	174	66,9	72	75,0	29	70,7	26	46,4	47	70,1	
Contorno epidérmico											0,004
Atrofia/adelgazado	13	5,1	3	3,0	2	4,80	3	5,80	5	7,8	
Normal	94	36,6	49	49,5	13	31,0	21	40,4	11	17,2	
Aumentado	150	58,4	47	47,5	27	64,3	28	53,8	48	75,0	

CAPÍTULO 12

Morfología celular												0,484
Redonda/ovoide	303	94,4	122	94,6	47	97,9	64	91,4	70	94,6		
Alargada/fusiforme	12	3,7	3	2,3	1	2,1	5	7,1	3	4,1		
No hay predominio	6	1,9	4	3,1	0	0,0	1	1,4	1	1,4		
Ulceración												<0,001
No	234	74,8	101	82,1	38	80,9	55	78,6	40	54,8		
Si	79	25,2	22	17,9	9	19,1	15	21,4	33	45,2		
Tipo ulceración												0,004
No	233	76,1	101	83,5	38	82,6	54	78,3	40	57,1		
Expansiva	33	10,8	9	7,4	4	8,7	6	8,7	14	20,0		
Infiltrativa	40	13,1	11	9,1	4	8,7	9	13	16	22,9		
Regresión												0,899
Ausente	294	91,9	117	90,7	46	95,8	63	90	68	93,2		
Menor a 50%	14	4,4	7	5,4	1	2,1	4	5,7	2	2,7		
Mayor a 50%	12	3,8	5	3,9	1	2,1	3	4,3	3	4,1		
Elastosis												<0,001
No CSD	270	91,2	108	94,7	43	95,6	50	75,8	69	97,2		
CSD	26	8,8	6	5,3	2	4,4	16	24,2	2	2,8		
Elastosis 3 cat												0,020
Ausencia	164	60,7	52	65	41	67,2	15	42,9	56	59,6		
No CSD	89	33	26	32,5	17	27,9	12	34,3	34	36,2		
CSD	17	6,3	2	2,5	3	4,9	8	22,9	4	4,3		
Pseudoacantólisis												0,099
No	266	82,6	111	86	41	85,4	60	84,5	54	73		
Sí	56	17,4	18	14,0	7	14,6	11	15,5	20	27		
Polipoide												<0,001
No	283	89,6	123	96,9	42	87,5	63	91,3	55	76,4		
Si	33	10,4	4	3,1	6	12,5	6	8,7	17	23,6		
Tipo histológico												<0,001
LMM	16	4,9	6	4,6	1	2	7	9,7	2	2,7		
MES	183	56,1	79	60,8	30	60	36	50	38	51,4		
MN	91	27,9	21	16,2	15	30	24	33,3	31	41,9		
MLA	26	8,0	22	16,9	4	8	0	0,0	0	0		
Otros sin clasificar	10	3,1	2	1,5	0	0	5	6,9	3	4,1		
Breslow												<0,001
≤2 mm	192	58,9	92	70,8	33	66	35	48,6	32	43,2		
>2 mm	134	41,1	38	29,2	17	34	37	51,4	42	56,8		
Nevus previo												0,332
No	253	78,1	99	76,7	38	76,2	61	85,9	55	74,3		
Sí	71	21,9	30	23,3	12	24,0	10	14,1	19	25,7		
Infiltrado linfocítico intratumoral												0,197
No	136	43,7	59	47,6	22	45,8	33	47,8	22	31,4		
“Non-brisk”	167	53,7	60	48,4	25	52,1	36	52,2	46	65,7		
“Brisk”	8	2,6	5	4,0	1	2,1	0	0	2	2,9		
Tasa mitosis												<0,001
0 mit/mm <sup>2</sup>	73	23	45	36	7	14,3	17	24,3	4	5,5		
1-5 mit/mm <sup>2</sup>	189	59,6	72	57,6	38	77,6	36	51,4	43	58,9		
>5 mit/mm <sup>2</sup>	55	17,4	8	6,4	4	8,2	17	24,3	26	35,6		

ANEXOS

Satelitosis microscópica	310	95,4	126	96,9	48	96	69	95,8	67	91,8	0,403
No	15	4,6	4	3,1	2	4	3	4,2	6	8,2	
Sí											
Invasión vascular	317	97,5	128	98,5	50	100	70	97,2	69	94,5	0,210
No	8	2,5	2	1,5	0	0	2	2,8	4	5,5	
Sí											
Invasión perineural	319	98,8	126	98,4	50	100	71	98,6	72	98,6	0,859
No	4	1,2	2	1,6	0	0	1	1,4	1	1,4	
Sí											

9.3 Regresión logística univariada de la asociación de las variables de estudio con la presencia o ausencia de mutaciones en el promotor de TERT

Variable	OR	IC 95% OR	P
Extensión pagetoide			0,104
No	Ref.	Ref.	
Sí	0,7	0,5-1,1	
Nidos			0,004
No	Ref.	Ref.	
Sí	0,5	0,3-0,8	
Pigmentación			0,004
No	Ref.	Ref.	
Si	0,5	0,3-0,8	
Distribución del pigmento			(0,007)
Ausente	Ref.	Ref.	
Focal	0,6	0,3- 1,1	0,105
Extenso	0,4	0,2-0,7	0,002
Patrón de crecimiento			0,020
Expansivo	Ref.	Ref.	
Infiltrativo	0,6	0,3-0,9	
Morfología celular			(0,375)
Redonda/ovoide	Ref.	Ref.	
Alargada/fusiforme	2,1	0,7-6,7	0,190
No hay predominio	0,7	0,1-3,7	0,645
Ulceración			0,001
No	Ref.	Ref.	
Sí	2,3	1,4-3,9	
Regresión			(0,889)
Ausente	Ref.	Ref.	
Menor a 50%	1,0	0,3-3,0	0,997
Mayor a 50%	1,3	0,4-4,2	0,627
Elastosis			0,05
No CSD	Ref.	Ref.	
CSD	2,2	1,0-4,9	

CAPÍTULO 12

Elastosis 3 cat			(0,009)
Ausencia	Ref.	Ref.	
No CSD	1,5	0,9-2,4	0,088
CSD	3,6	1,5-8,7	0,004
Acantólisis			0,05
No	Ref.	Ref.	
Sí	1,8	1,0-3,1	
Polipoide			0,002
No	Ref.	Ref.	
Sí	3,4	1,6-7,5	
Tipo histológico			(0,008)
LMM	Ref.	Ref.	
MES	0,6	0,2-1,7	0,363
MN	1,4	0,5-3,9	0,491
MLA	NC	NC	0,998
Otros sin clasificar	4,0	0,7-24,3	0,132
Breslow			<0,001
≤2 mm	Ref.	Ref.	
>2 mm	2,6	1,7-4,1	
Nevus previo			0,311
No	Ref.	Ref.	
Sí	0,8	0,5-1,3	
Infilt. Linfoc. intratumoral			(0,110)
No	Ref.	Ref.	
“Non-brisk”	1,5	0,9-2,3	0,091
“Brisk”	0,5	0,1-2,3	0,333
Tasa mitosis			(<0,001)
0 mit/mm <sup>2</sup>	Ref.	Ref.	
1-5 mit/mm <sup>2</sup>	1,9	1,0-3,3	0,035
>5 mit/mm <sup>2</sup>	9,0	4,1-19,9	<0,001
Satelitosis microscópica			0,276
No	Ref.	Ref.	
Sí	1,8	0,6-4,8	
Invasión vascular			0,086
No	Ref.	Ref.	
Sí	4,1	0,8-20,7	
Invasión perineural			0,792
No	Ref.	Ref.	
Sí	1,3	0,2-9,4	

ANEXOS

9.4 Regresión logística multinomial univariada

Variable	BRAF			TERT			BRAF+TERT		
	OR	IC 95% OR	P	OR	IC 95% OR	P	OR	IC 95% OR	P
Ext paget.									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	1,3	0,7-2,5	0,512	0,7	0,4-1,2	0,154	0,8	0,5-1,5	0,551
Nidos									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	0,7	0,4-1,4	0,339	0,4	0,2-0,7	0,002	0,6	0,3-1,2	0,057
Pigmentación Intensa									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	0,9	0,4-2,1	0,817	2,6	1,4-4,9	0,004	1,5	0,7-2,8	0,274
Distribución del pigmento									
Ausente	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Focal	2,0	0,6-6,8	0,259	0,5	0,2-1,2	0,124	0,9	0,4-2,3	0,845
Extensa	1,6	0,6-4,6	0,383	0,4	0,2-0,7	0,004	0,6	0,3-1,4	0,245
Patrón crecimiento									
Infiltrativo	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Expansivo	1,2	0,6-2,8	0,604	3,4	1,7-7,0	0,001	1,2	0,6-2,6	0,493
Morfología celular									
Redonda/ovoide	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Alargada/fusiforme	0,9	0,1-8,5	0,901	3,2	0,7-13,7	0,121	1,7	0,3-8,9	0,503
No hay predominio	NC	NC	NC	0,5	0,1-4,4	0,511	0,4	0,1-4,0	0,461
Ulceración									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	1,1	0,5-2,6	0,849	1,3	0,6-2,6	0,548	3,8	2,0-7,3	<0,001
Regresión									
Ausente	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Menor a 50%	0,4	0,0-3,0	0,350	1,1	0,3-3,8	0,927	0,5	0,1-2,4	0,384
Mayor a 50%	0,5	0,1-4,5	0,542	1,1	0,3-4,8	0,885	1,0	0,2-4,5	0,966
Elastosis									
No CSD	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
CSD	0,7	0,2-3,7	0,713	5,0	1,9-12,7	0,001	0,5	0,1-2,3	0,358
Elastosis 3 cat									
Ausencia	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.			Ref.	
No CSD	0,8	0,4-1,7	0,503	2,0	1,0-3,8	0,044	1,2	0,7-2,3	0,502
CSD	1,0	0,2-5,3	0,978	9,2	3,1-27,2	<0,001	0,7	0,1-3,9	0,703
Acantólisis									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	1,1	0,4-2,7	0,915	1,1	0,5-2,6	0,767	2,3	1,1-4,7	0,024
Polipoide									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	4,4	1,2-16,3	0,027	2,9	0,8-10,8	0,106	9,5	3,1-29,6	<0,001
Tipo histológico									
LMM	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
MES	1,1	0,1-11,2	0,943	NC	NC	NC	Ref.	NC	NC
MN	4,3	0,5-39,4	0,199	1,0	0,3-3,4	0,974	4,4	0,8-24,1	0,085
MLA	2,3	0,3-19,7	0,455	0,4	0,1-1,3	0,112	1,4	0,3-7,5	0,662
Otros sin clasificar	NC	NC	NC	2,1	0,3-15,4	0,448	4,5	0,4-49,6	0,219
Breslow									
≤2 mm	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
>2 mm	1,2	0,6-2,5	0,534	2,6	1,4-4,7	0,002	3,2	1,8-5,8	<0,001
Nevus previo									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	1,0	0,5-2,2	0,916	0,5	0,3-1,2	0,124	1,1	0,6-2,2	0,698
Infilt. Linfoc. intratumoral									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
"Non-brisk"	1,1	0,6-2,2	0,748	1,1	0,6-2,0	0,817	2,1	1,1-3,8	0,023
"Brisk"	0,5	0,1-4,9	0,579	NC	NC	NC	1,1	0,2-5,9	0,936
Tasa mitosis									
0 mit/mm <sup>2</sup>	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
1-5 mit/mm <sup>2</sup>	3,3	1,4-8,3	0,007	1,3	0,7-2,6	0,424	6,7	2,3-20,0	0,001
>5 mit/mm <sup>2</sup>	3,2	0,8-13,6	0,112	5,6	2,1-15,4	0,001	36,6	10,0-133,3	<0,001
Satelitosis microscópica									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	1,3	0,2-7,4	0,758	1,4	0,3-6,3	0,686	2,8	0,8-10,3	0,118
Invasión vascular									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	NC	NC	NC	1,8	0,3-13,3	0,551	3,7	0,7-20,1	0,136
Invasión perineural									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sí	NC	NC	NC	0,9	0,1-10,0	0,923	0,9	0,1-9,8	0,914

CAPÍTULO 12

Tabla morfología y área celular cuantitativa según presencia o ausencia de mutación en pTERT

	pTERT+	pTERT-	p
Morfología celular (cuantitativa)			0,783
N (%)	147 (43,4)	192 (56,6)	
x	0,64	0,62	
Área celular			0,043
N (%)	147 (43,4)	192 (56,6)	
x	319,15	296,37	

Tabla morfología y área celular según perfil mutacional según las combinaciones entre pTERT y BRAF

	TOTAL	BRAF-/pTERT-	BRAF+/pTERT-	BRAF-/TERT+	BRAF+/TERT+	p
Morfología celular (cuantitativa)						0,093
N (%)	323 (100)	130 (38,4)	48 (14,2)	71 (22,0)	74 (21,8)	
x	0,63	0,62	0,62	0,62	0,66	
Área celular						0,045
N (%)	323 (100)	130 (38,4)	48 (14,2)	71 (22,0)	74 (21,8)	
x	308,49	296,82	304,52	292,42	346,98	

## ANEXOS