

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**“EVALUACIÓN ESTANDARIZADA DE LA EXPRESIÓN DEL
INMUNOMARCADOR PRAME EN LESIONES MELANOCÍTICAS
LIMÍTROFES Y ANÁLISIS DE SU CORRELACIÓN CON HALLAZGOS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y PRONÓSTICOS EN LA POBLACIÓN DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ” EN EL
PERÍODO DE 2016 A 2023.”**

**POR
DRA. VERÓNICA MARTÍNEZ HERRERA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

MONTERREY, N.L., MÉXICO

DICIEMBRE 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA



“EVALUACIÓN ESTANDARIZADA DE LA EXPRESIÓN DEL
INMUNOMARCADOR PRAME EN LESIONES MELANOCÍTICAS LIMÍTROFES
Y ANÁLISIS DE SU CORRELACIÓN CON HALLAZGOS CLÍNICO-
PATOLÓGICOS Y PRONÓSTICOS EN LA POBLACIÓN DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ” EN EL PERÍODO DE
2016 A 2023”

POR
DRA. VERÓNICA MARTÍNEZ HERRERA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

DIRECTOR: DR. RODOLFO FRANCO MÁRQUEZ
CODIRECTOR: DRA. ITZEL ARACELI ORTIZ MEZA

MONTERREY, N.L, MÉXICO

DICIEMBRE 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ"
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA

"EVALUACIÓN ESTANDARIZADA DE LA EXPRESIÓN DEL INMUNOMARCADOR PRAME EN LESIONES MELANOCÍTICAS LIMÍTROFES Y ANÁLISIS DE SU CORRELACIÓN CON HALLAZGOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y PRONÓSTICOS EN LA POBLACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ" EN EL PERÍODO DE 2016 A 2023."

Aprobación de Tesis:

Dr. Rodolfo Franco Márquez

Director de la tesis

Dra. Itzel Araceli Ortiz Meza

Codirector de la tesis

Dra. Natalia Vilches Cisneros

Coordinador de Enseñanza

Dr. med. Juan Pablo Flores Gutiérrez

Coordinador de investigación

Dra. Oralía Barboza Quintana

Jefe de servicio o departamento

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de estudios de posgrado

**"EVALUACIÓN ESTANDARIZADA DE LA EXPRESIÓN DEL
INMUNOMARCADOR PRAME EN LESIONES MELANOCÍTICAS LIMÍTROFES
Y ANÁLISIS DE SU CORRELACIÓN CON HALLAZGOS CLÍNICO-
PATOLÓGICOS Y PRONÓSTICOS EN LA POBLACIÓN DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO "DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ" EN EL PERÍODO DE
2016 A 2023."**

PRESENTADA POR:

DRA. VERÓNICA MARTINEZ HERRERA

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA
PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR.
JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ", BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RODOLFO
FRANCO MÁRQUEZ Y LA CODIRECCIÓN DEL DRA. ITZEL ARACELI ORTIZ
MEZA.



Dr. Med. Oralia Barboza Quintana

Jefe del Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología

DICIEMBRE 2025

Agradecimientos

A mis padres, amigos y profesores por enseñarme tanto.

A Alejandro Mier, quien es mi brújula.

Contenido

Aprobación de tesis	i
Lugar de trabajo	ii
Agradecimientos	iii
Contenido	iv
Lista de abreviaturas	v
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
Capítulo I. Marco teórico	1
1.1 Introducción a las lesiones melanocíticas	1
1.2 Epidemiología	1
1.3 Etiología y patogenia	2
1.4 Presentación clínica	3
1.5 Histopatología y graduación	4
1.6 Auxiliares diagnósticos	6
1.7 Diagnósticos diferenciales	7
1.8 Tratamiento y pronóstico	7
1.9 Panorama de estudio, PRAME y patología digital	7
Capítulo II. Justificación	10
Capítulo III. Hipótesis	10
3.1 Hipótesis alterna	10
3.2 Hipótesis nula	10
3.3 Hipótesis específicas	11
Capítulo IV. Objetivos	11
4.1. Objetivo general	11
4.2 Objetivos específicos	11
Capítulo V. Material y Métodos	12
5.1 Tipo y diseño de estudio y lugar de trabajo	12

5.2 Tamaño de la muestra y población de estudio	12
5.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	13
5.4 Variables de estudio	14
Definición y operacionalización de las variables	16
Atipia arquitectural	16
Atipia citológica	17
Definición del score combinado y H-score	17
5.5 Obtención de la base de datos	18
5.6 Microarreglos de tejido	18
5.7 Inmunohistoquímica	19
Controles de tejido	20
5.8 Evaluación manual de la expresión de PRAME	21
5.9 Digitalización y evaluación de PRAME en QuPath	21
5.10 Entrenamiento del algoritmo de análisis en QuPath	22
5.11 Análisis estadístico	26
 Capítulo VI. Resultados	27
Capítulo VII. Discusión	40
Capítulo VIII. Conclusiones	43
Capítulo IX Bibliografía	45

Glosario de abreviaturas

DAB: Diaminobencidina

FAMM: Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome

H&E: Hematoxilina y eosina

H-score: Histochemical score

IHQ: Inmunohistoquímica

IARC: International Agency for Research on Cancer

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

OMS / WHO: Organización Mundial de la Salud / World Health Organization

PRAME: Preferentially Expressed Antigen in Melanoma

ROI: Region of Interest (Región de interés)

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TMA: Tissue Microarray (Microarreglo de tejidos)

UV: Radiación ultravioleta

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de atipia arquitectural	5
Tabla 2. Criterios de atipia citológica.....	6
Tabla 3. Tabla de variables de estudio	15
Tabla 4. Características clínicas de la población de estudio.....	30
Tabla 5. Características histopatológicas de las lesiones.....	32
Tabla 6. Distribución del evento clínico final.....	33
Tabla 7. Concordancia interobservador del score combinado de PRAME (índice Kappa de Fleiss)	39
Tabla 8. Concordancia entre evaluación manual y análisis digital de PRAME (Kappa de Cohen ponderado).....	39

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1. Bloque de arreglo de tejidos (TMA)	19
Figura 2. Tejido de control para IHQ de PRAME.....	20
Figura 3. Separación de tinciones en QuPath.....	22
Figura 4. Detección celular y segmentación nuclear en QuPath.....	23
Figura 5. Detección celular y segmentación nuclear alternativo en QuPath.....	23
Figura 6: Anotación manual de regiones de interés en QuPath.....	24
Figura 7: Detección de intensidad y clasificación celular en QuPath.....	24
Figura 8: Mapa de intensidad en lesión en QuPath.....	25
Figura 9. Diagrama de flujo de evaluación de PRAME.....	25
Figura 10. Distribución de los casos por sexo.....	27
Figura 11. Distribución de los casos por edad.....	28
Figura 12. Distribución de casos por tamaño de lesión.....	29
Figura 13. Distribución de las lesiones por región anatómica.....	31
Figura 14. Variabilidad en la expresión de PRAME.....	34
Figura 15. Score combinado manual entre y análisis digital.....	35
Figura 16. Score combinado según el grado de displasia.....	36
Figura 17. H-score (digital) de PRAME según el evento clínico final.....	37
Figura 18. Score combinado (manual) según el evento clínico final.....	38
Figura 19. Bland–Altman para la concordancia entre observadores	40

RESUMEN

Introducción:

PRAME (Preferentially Expressed Antigen in Melanoma) es un marcador de inmunohistoquímica ampliamente utilizado en el diagnóstico de lesiones melanocíticas; sin embargo, su utilidad y reproducibilidad en lesiones melanocíticas limítrofes continúan siendo motivo de debate.

Objetivo:

Evaluar de forma estandarizada la expresión de PRAME en lesiones melanocíticas limítrofes mediante análisis manual y digital, y correlacionarla con características clínicas, histopatológicas y pronósticas en una cohorte retrospectiva de casos diagnosticados entre 2016 y 2023.

Material y métodos:

Se realizó un estudio observacional retrospectivo que incluyó lesiones melanocíticas limítrofes con seguimiento clínico disponible. La expresión de PRAME se evaluó mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejidos, utilizando un score combinado semicuantitativo manual (porcentaje de células positivas e intensidad) y un análisis digital mediante QuPath, con obtención de H-score continuo. Se analizaron asociaciones con variables clínicas, grado de displasia, atipia citológica y arquitectural, así como con eventos clínicos finales. La concordancia interobservador y entre métodos se evaluó mediante kappa de Fleiss, kappa de Cohen ponderado, correlación de Spearman y análisis de Bland–Altman.

Resultados:

La mayoría de los casos mostró resolución clínica (91.3%), con baja frecuencia de recurrencia. Se identificó una correlación positiva baja a moderada entre la expresión de PRAME y el grado de displasia, tanto en el análisis digital ($p = 0.332$, $p = 0.004$) como en la evaluación manual. El H-score de PRAME se correlacionó

significativamente con la atipia citológica, pero no con la atipia arquitectural. No se observaron diferencias significativas en la expresión de PRAME según el evento clínico final. La concordancia interobservador para el score combinado fue moderada ($\kappa = 0.51$), mientras que la concordancia entre la evaluación manual final y el análisis digital mediante QuPath fue buena ($\kappa = 0.66$). El análisis de Bland–Altman no mostró un sesgo sistemático relevante entre ambos métodos.

Conclusiones:

La expresión de PRAME se asocia con el grado de displasia y la atipia citológica en lesiones melanocíticas limítrofes, aunque no con el desenlace clínico. La evaluación digital mediante QuPath mostró una buena concordancia con la valoración manual, respaldando su utilidad como herramienta complementaria para la estandarización y reproducibilidad de la evaluación de PRAME en la práctica diagnóstica.

ABSTRACT

Introduction:

PRAME (Preferentially Expressed Antigen in Melanoma) serves as an immunomarker commonly used for diagnosing melanocytic lesions. However, its effectiveness and consistency in borderline melanocytic lesions are still subjects of ongoing debate.

Objective:

To evaluate the expression of PRAME in borderline melanocytic lesions in a standardized manner using manual and digital analyses, and to correlate its expression with clinical, histopathological, and prognostic features in a retrospective cohort of cases diagnosed between 2016 and 2023.

Materials and Methods:

An observational retrospective study was conducted including borderline melanocytic lesions with available clinical follow-up. PRAME expression was assessed by immunohistochemistry on tissue microarrays using a semiquantitative manual combined score (percentage of positive cells and staining intensity) and digital analysis with QuPath, obtaining a continuous H-score. Associations with clinical variables, degree of dysplasia, cytological and architectural atypia, and final clinical outcomes were analyzed. Interobserver and intermethod agreement were assessed using Fleiss' kappa, weighted Cohen's kappa, Spearman's correlation, and Bland–Altman analysis.

Results:

Most cases showed clinical resolution (91.3%), with a low frequency of recurrence. A low to moderate positive correlation was identified between PRAME expression and the degree of dysplasia, both in digital analysis ($\rho = 0.332$, $p = 0.004$) and manual evaluation. The PRAME H-score correlated significantly with cytological atypia but not with architectural atypia. No significant differences in

PRAME expression were observed according to final clinical outcome. Interobserver agreement for the combined score was moderate ($\kappa = 0.51$), while agreement between the final manual assessment and digital analysis using QuPath was good ($\kappa = 0.66$). Bland–Altman analysis showed no relevant systematic bias between the two methods.

Conclusions:

PRAME expression is associated with the degree of dysplasia and cytological atypia in borderline melanocytic lesions, but not with clinical outcome. Digital evaluation using QuPath demonstrated good agreement with manual assessment, supporting its usefulness as a complementary tool for the standardization and reproducibility of PRAME evaluation in diagnostic practice.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción a las lesiones melanocíticas limítrofes

Las lesiones melanocíticas de la piel se encuentran dentro de un espectro que va desde los nevos benignos hasta el melanoma maligno. Dentro de este espectro se incluye una categoría intermedia de lesiones melanocíticas limítrofes, también llamadas atípicas o displásicas, cuyo diagnóstico representa un desafío tanto en el ámbito clínico como en el histopatológico (1). En el año 1992, el NIH de los Estados Unidos realizó una recomendación para que el término “nevo displásico” fuera reemplazado por “nevo atípico” y si tras la evaluación histológica las lesiones fueran referidas como nevos con desorden arquitectural en donde se también se comentara la presencia y el grado de atipia en los melanocitos (3), sin embargo, en la práctica clínica actual, los términos continúan utilizándose de forma indistinta. Cabe mencionar que el término “nevo displásico” se utiliza para hacer referencia al diagnóstico patológico de la lesión.

De acuerdo con el libro azul de la clasificación de tumores de la piel de la OMS en su quinta edición, un nevo displásico se define como un nevo melanocítico benigno que es clínicamente atípico e histológicamente se caracteriza por presentar desorden arquitectural y atipia citológica (4). Estas características también pueden encontrarse en ciertos tipos de melanoma, junto con la presencia de actividad mitótica focal (5), lo que dificulta su diagnóstico.

1.2 Epidemiología

Se ha reportado una prevalencia de nevos atípicos/displásicos que va del 2 al 10% en poblaciones caucásicas, se cree que la variación en la prevalencia se debe a que los criterios para su diagnóstico pueden ser diferentes. En un principio, estas lesiones fueron descritas en familias con melanoma hereditario, pero posteriormente también se identificaron en pacientes sin antecedentes

familiares (6). Si bien algunos estudios han identificado asociaciones genéticas, estas aún carecen de utilidad clínica. Los nevos atípicos suelen aparecer durante la adolescencia y su frecuencia disminuye con la edad, aunque se pueden presentar en un amplio rango de edad. Un estudio encontró que el 43 % de los pacientes con melanoma presentaban al menos un nevo displásico (7). El riesgo de melanoma se asocia especialmente con nevos de displasia moderada o severa, así como con un mayor número de lesiones (8).

1.3 Etiología y patogenia

Las alteraciones moleculares constituyen la base genética para el entendimiento del origen de las lesiones melanocíticas, dichas alteraciones impulsan el desarrollo de nevos benignos, lesiones intermedias (atípicas/displásicas) o melanoma invasivo (7-12). Estas lesiones comparten alteraciones, y entre las primeras que ocurren se encuentran las mutaciones “iniciadoras” que activan la vía de las MAP quinasas (MAPK), como BRAF V600E o mutaciones en NRAS que condicionan el inicio de la proliferación celular (19,12,13). Se ha descrito que este proceso se ve significativamente influenciado por factores ambientales como la exposición a la radiación ultravioleta (UV), la cual induce un daño genético acumulativo y favorece la aparición de mutaciones patogénicas clave (14,15).

En los nevos melanocíticos benignos esta activación induce un estado de senescencia oncogénica, que es el mecanismo antitumoral inicial mediado por la integridad p16 (14), que se produce por la activación aberrante de oncogenes; y mediante este, las células melanocíticas entran en un estado de detención irreversible del ciclo celular, limitando así la progresión tumoral a melanoma, independientemente de que se hayan producido mutaciones oncogénicas (9).

Ahora bien, en los nevos atípicos/displásicos el mecanismo se ubica en una etapa intermedia dentro del espectro de progresión, y aunque presentan mutaciones iniciadoras como en los nevos benignos, también desarrollan alteraciones genéticas adicionales, la principal en CDKN2A que en términos simples condiciona un estado de inestabilidad genómica. No obstante, hasta ahora se

sabe que, cuando las lesiones progresan, aparecen alteraciones secundarias, como las mutaciones en el promotor de TERT, que inducen la activación de la telomerasa y permiten a las células evadir la senescencia oncogénica, lo que facilita un estado de división celular continua (11,14,15).

En cuanto al melanoma, las alteraciones moleculares se acumulan de manera progresiva y en esta etapa más avanzada, se encuentran la inactivación bialélica de CDKN2A y alteraciones en PTEN y TP53, que se asocian principalmente a melanomas invasivos (13-15). La radiación ultravioleta actúa como mutágeno dominante en todas las etapas del proceso, contribuyendo de manera crítica a la acumulación de mutaciones y a la inestabilidad cromosómica (12,14).

Los nevos atípicos pueden ser esporádicos o desarrollarse en el contexto del Síndrome de melanoma familiar asociado a nevos atípicos (FAMM, por sus siglas en inglés), una enfermedad autosómica dominante en la que los pacientes desarrollan una gran cantidad de nevos atípicos, por lo general más de 50, y además, cuentan con historia familiar de melanoma en uno más familiares de primera línea, este síndrome se asocia a variantes patogénicas en el gen CDKN2A (16).

1.4 Presentación clínica

Los nevos atípicos/displásicos aparecen comúnmente durante la pubertad, pero pueden desarrollarse a lo largo de la vida (17). Esta es una diferencia sutil que tienen con los nevos benignos, que suelen aparecer después de los 6 meses de edad, con un pico entre los 30 y 40 años y posteriormente sufren regresión.

Alrededor de la mitad de los nevos atípicos/displásicos suelen cambiar de apariencia en el transcurso de hasta 6 años, mientras que un porcentaje menor puede presentar un comportamiento más volátil (3,8). Suelen presentarse con mayor frecuencia en el tronco y las extremidades, aunque también pueden desarrollarse en cualquier parte del cuerpo; con menor frecuencia se presentan en las manos o en zonas con exposición solar crónica. Las características clínicas que los distinguen son:

- Tamaño mayor a 5 mm
- Componente macular y con menor frecuencia papular con aspecto de tiro al blanco
- Topografía mamelonada (empedrado) y a veces rugoso.
- Asimetría
- Bordes irregulares
- Coloración heterogénea.

Usualmente presentan un patrón por dermatoscopia regular (cualquiera de los 10 patrones benignos), mientras que los melanomas usualmente tienen un patrón irregular, siendo el de mayor sospecha el patrón paralelo (1,18).

1.5 Histopatología y clasificación

La gran mayoría de los nevos atípicos presenta hallazgos histológicos de displasia que incluyen: atipia/desorden arquitectural, atipia citológica y respuesta local inmune como inflamación de la dermis con predominio de linfocitos, fibrosis concéntrica eosinofílica (fibroplasia lamelar) y neovascularización (8,18). Estos hallazgos pueden observarse en casos de melanoma *in situ*, por lo que la distinción representa un reto diagnóstico muy común.

La displasia histológica melanocítica se define por la presencia de alteraciones arquitectónicas y citológicas moderadas o severas (5,7,8,18).

Las alteraciones arquitecturales son: hiperplasia lentiginosa con alongamiento de las crestas dérmicas o nidos proliferativos de melanocitos en la capa basal de la epidermis; extensión periférica del componente de unión hacia la dermis (fenómeno de “shouldering”); nidos de melanocitos distribuidos a los costados de las crestas o en la unión dermoepidérmica supra papilar; y nidos de melanocitos con fusión intraepidérmica o formación de puentes (5,7).

La atipia citológica se caracteriza por núcleos aumentados de tamaño, irregulares, hiperclorámicos, con cromatina densa, polimorfismo y nucleolos prominentes. La severidad se determina comparando el tamaño nuclear de los

melanocitos con el de los queratinocitos basales vecinos. Las mitosis melanocíticas son poco comunes; cuando están presentes, conllevan una mayor sospecha de melanoma. A continuación, se presentan los criterios establecidos por la OMS, desglosados y clasificados por severidad para el diagnóstico histopatológico (1,3).

Característica	No atípico / displasia leve	Displasia de bajo grado (antes moderada)	Displasia de alto grado (antes severa)	Melanoma
Tamaño	Cualquier tamaño, usualmente < 4 mm	> 4 mm	> 4 mm	Cualquier tamaño
Circunscriptión lateral	Nítida o ligeramente disminuida	Moderada	Moderada	Frecuentemente pobre
Simetría	Buena	Buena	Frecuentemente alterada	Rara
Extensión de la unión	Puede ser leve	Habitual	Habitual	Extensa
Distorsión de crestas epidérmicas	Ocasional	Habitual	Siempre	Ocasional
Fibrosis	Nula o leve	Habitual – concéntrica y lamelar	Habitual – concéntrica y lamelar	Habitual – difusa
Distribución de nidos	Nidos uniformemente distribuidos	Nidos en puente	Nidos en puente, algunos confluentes	Nidos confluentes
Migración ascendente (patrón pagetoide)	Ocasional, central	Ocasional, central	Ocasional, usualmente central	Frecuentemente extensa
Placas suprapapilares (patrón lentiginoso)	Respetadas	Generalmente respetadas	Frecuentemente involucradas con células aisladas	Involucradas (proliferación continua de células aisladas y/o nidos)
Citoplasma	Escaso	Finamente pigmentado	Variable (pigmentado o eosinófilo pálido)	Marcadamente variable
Tamaño nuclear	Pequeño	Mediano	Mayor	Usualmente grande
Nucléolos	Pequeños	Medianos	Mayores	Frecuentemente grandes
Cromatina	Uniforme	Parcialmente expandida	Expandida, gruesa en algunas células	Expandida, hiperchromática y gruesa
Mitosis en unión y/o dermis	Ausentes o muy raras	Ausentes o muy raras	Raras; preocupantes si están en células atípicas	Pueden ser numerosas

Tabla 1. Criterios de atipia citológica en nevos displásicos.

Fuente: Traducción y adaptación de WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Dysplastic naevi. WHO Classification of Skin Tumours*, 5^a ed., vol. 12.

Grado OMS (desde 4 ^a edición)	Tamaño nuclear	Cromatina	Variación de tamaño y forma nuclear	Nucléolo
No corresponde a nevo displásico	1×	Puede ser hipercromática	Mínima	Pequeño o ausente
Displasia de bajo grado	1–1.5×	Hipercromática o dispersa	Prominente en una minoría de células (atipia aleatoria)	Pequeño o ausente
Displasia de alto grado	≥ 1.5×	Hipercromática, granular gruesa o con condensación periférica	Prominente en una minoría mayor de células	Prominente, frecuentemente eosinófilo

Tabla 2. Criterios de atipia citológica en nevos displásicos.

Fuente: Traducción y adaptación de WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Dysplastic naevi. WHO Classification of Skin Tumours*, 5^a ed., vol. 12.

Anteriormente, el grado de displasia se graduaba en tres categorías, leve, moderada y severa, y recientemente se ha propuesto el sistema de dos grados, en el que las lesiones que presentan displasia leve se clasificarán como nevos comunes, la displasia moderada será de bajo grado y la displasia severa será de alto grado. Lo anterior tiene como objetivo mejorar la reproducibilidad al momento de la evaluación (3).

1.6 Auxiliares diagnósticos

En este contexto, los auxiliares de diagnóstico histopatológico, corresponden a las tinciones de inmunohistoquímica; sin embargo, no se utilizan con frecuencia. Los marcadores de melanocitos positivos serán: S100, melan-A, MITF y SOX10, que pueden ser útiles para resaltar la distribución celular en patrones complejos (19). El marcador HMB45 puede tener una disminución gradual en la expresión que va de las células melanocíticas más superficiales hacia las más profundas. El índice de proliferación celular es usualmente bajo cuando es evaluado con Ki67, este suele ser menor al 5%. Se pueden realizar estudios moleculares por FISH y perfiles genéticos en casos de difícil diagnóstico (19,20).

1.7 Diagnósticos diferenciales

Entre los diagnósticos diferenciales benignos que deben considerarse están el léntigo simple, nevo lentiginoso y nevo común; en algunas ocasiones, estas lesiones pueden presentar atipia focal arquitectural o citológica sobre todo si se asocian con algún proceso reactivo (1,8,12). Por otro lado, el melanoma es el diagnóstico diferencial principal en estas lesiones, ya que tanto las características clínicas como las histopatológicas se superponen en estas dos entidades. Cabe mencionar que existen otros tipos de nevos, los nevos de sitio especial, que pueden presentar rasgos histológicos displásicos focales, sin embargo, estos deben ser evaluados detenidamente, para no subestimar los cambios observados (19).

1.8 Tratamiento y pronóstico

El tratamiento de los nevos atípicos/displásicos depende del grado de displasia, algunos autores sugieren que el seguimiento clínico estrecho es suficiente para lesiones con displasia de bajo grado (20), mientras que para las lesiones con displasia de alto grado se recomienda la resección completa con margen quirúrgico de seguridad, ya que el riesgo de persistencia, recurrencia es más elevado en resecciones incompletas o limitadas (21-23).

El pronóstico a corto, mediano y largo plazo es bueno, especialmente en lesiones con resección quirúrgica completa. No obstante, el diagnóstico de un nevo atípico/displásico representa un incremento en el riesgo de desarrollar melanoma en otra región de la piel. Por esta razón, el seguimiento clínico se mantiene a largo plazo (22-25).

1.9 PRAME, patología digital y panorama actual

A pesar de las estrategias que llevaron al desarrollo de criterios clínicos e histopatológicos con el objetivo de mejorar la precisión diagnóstica, persiste una

gran dificultad para identificar correctamente este tipo de lesiones cuando sus características se superponen. Durante las últimas dos décadas se han estudiado diversos marcadores de inmunohistoquímica que puedan ser de utilidad en este tipo de casos (14,26,27); sin embargo, la mayoría de los marcadores melanocíticos disponibles no son capaces de discriminar entre lesiones benignas y malignas.

Una de las excepciones es el marcador PRAME (Preferentially Expressed Antigen in Melanoma) que es un antígeno asociado al cáncer, identificado a finales de los 90, como un gen expresado en las células de melanoma (27-28). Actúa principalmente como un represor transcripcional dependiente del ácido retinoico (RAR), este último participa en funciones de diferenciación celular, detención del ciclo celular y apoptosis, por lo que cuando el PRAME está sobreexpresado, favorece la supervivencia y proliferación celular. En condiciones normales, su expresión es limitada o ausente, excepto en testículo, endometrio, ovario y placenta (26,29).

En la piel, los melanocitos benignos son prácticamente negativos; en este contexto, el marcador PRAME ha adquirido una mayor relevancia debido a que presenta una expresión elevada en melanomas y mínima o ausente en nevos benignos (29-31,35). Estudios recientes han demostrado que su utilidad no se limita al diagnóstico, sino que también posee valor pronóstico (32).

Diversos trabajos han descrito la expresión del inmunomarcador PRAME en series de lesiones melanocíticas, lo que refuerza su utilidad diagnóstica en contextos clínicamente desafiantes. Sin embargo, su interpretación aún carece de estandarización, lo que limita su aplicación sistemática en la práctica diaria (33-35).

Actualmente se emplean diferentes criterios para determinar la positividad, entre los cuales destaca el uso de puntajes combinados que integran el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción. Este enfoque semicuantitativo se basa en antecedentes como el Allred score, desarrollado originalmente para la evaluación de receptores hormonales en el cáncer de mama (36), y ha

demonstrado mejorar la reproducibilidad entre observadores en la interpretación inmunohistoquímica (37).

Adicionalmente, el desarrollo de tecnologías en análisis digital de imágenes ha abierto nuevas oportunidades para estandarizar e incluso automatizar la cuantificación de biomarcadores. QuPath es una plataforma de análisis digital que permite la segmentación celular, medición de intensidad de tinción y cálculo de H-score, brindando resultados objetivos y reproducibles (38,39).

La estadística de la prevalencia de lesiones melanocíticas en México se desconoce con certeza, los pocos estudios disponibles están enfocado en melanoma. Según datos de GLOBOCAN 2020, el melanoma cutáneo en nuestro país ocupa el puesto número 20 entre todas las neoplasias malignas, con una incidencia estimada de aproximadamente 2,198 casos nuevos por año y una prevalencia a cinco años de 5.8 por cada 100,000 personas-año. Cabe recalcar que en un estudio reciente, Lino-Silva y colaboradores, encontraron un incremento en la incidencia de melanoma, asociado en lesiones melanocíticas que previamente habían sido diagnosticadas como nevos displásicos (40,41). Este hallazgo abre paso a la necesidad de contar con herramientas diagnósticas objetivas que permitan diferenciar con mayor precisión las lesiones benignas de aquellas con potencial maligno (32,33).

Dado que no existen estudios en la población mexicana y la importancia de validar herramientas diagnósticas en contextos locales, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la expresión de PRAME, tanto de forma manual como automatizada, en una cohorte de pacientes con lesiones melanocíticas limítrofes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

II. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico certero de lesiones melanocíticas limítrofes es clave para evitar tanto el subtratamiento de melanomas como el manejo excesivo de nevos benignos. El marcador PRAME ha demostrado ser útil en este contexto, pero no cuenta con validación formal en México ni con un método interpretativo estandarizado.

Este estudio evaluó la expresión de PRAME mediante análisis manual y digital, generando evidencia local en un hospital de referencia. La combinación de inmunohistoquímica y tecnología digital permitió mejorar la precisión diagnóstica y aportar herramientas aplicables a la práctica clínica y académica.

III. HIPÓTESIS

3.1 ALTERNA

La expresión del inmunomarcador PRAME, evaluada mediante un sistema estandarizado que incluye análisis manual y digital, se correlaciona con hallazgos clínico-patológicos y pronósticos en lesiones melanocíticas limítrofes diagnosticadas en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” entre 2016 y 2023.

3.2 NULA

La expresión del inmunomarcador PRAME, evaluada mediante un sistema estandarizado que incluye análisis manual y digital, no se correlaciona con hallazgos clínico-patológicos y pronósticos en lesiones melanocíticas limítrofes diagnosticadas en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” entre 2016 y 2023.

3.3 ESPECÍFICAS

- Existe una asociación entre un mayor score de expresión de PRAME y la presencia de características clínicas de riesgo y hallazgos histopatológicos atípicos.
- El análisis digital automatizado con QuPath ofrece una alta concordancia con la evaluación manual de PRAME mediante un score semicuantitativo.
- La combinación de análisis manual y digital mejora la reproducibilidad diagnóstica frente a métodos convencionales no estandarizados.
- Niveles elevados de expresión de PRAME se asocian con mayor frecuencia de eventos clínicos adversos durante el seguimiento.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar de forma estandarizada la expresión del inmunomarcador PRAME en lesiones melanocíticas limítrofes, mediante análisis manual y digital, y analizar su correlación con características clínicas, histopatológicas y pronósticas en pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en el periodo 2016–2023.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar clínica e histopatológicamente las lesiones melanocíticas limítrofes diagnosticadas entre 2016 y 2023 en el Hospital Universitario.
- Evaluar, de forma manual y digital, la expresión inmunohistoquímica de PRAME mediante un sistema semicuantitativo basado en el porcentaje de positividad y la intensidad de tinción (score combinado y H-score)
- Determinar la concordancia entre los resultados del análisis manual y digital de PRAME.
- Analizar la asociación entre la expresión de PRAME y los hallazgos clínico-patológicos de las lesiones melanocíticas limítrofes.

- Explorar la relación entre los niveles de expresión de PRAME y los desenlaces clínicos durante el seguimiento (recurrencia, persistencia y desarrollo de nuevas lesiones atípicas).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Tipo y diseño de estudio y lugar de trabajo

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, con diseño mixto transversal–longitudinal.

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en Monterrey, Nuevo León, México.

Este hospital es una institución pública de tercer nivel y centro de referencia regional en el noreste del país. El Departamento de Anatomía Patológica cuenta con archivo físico y digital de biopsias, inmunohistoquímica de rutina, equipo de escaneo de laminillas y acceso a herramientas de análisis digital, lo que permitió realizar el estudio.

5.2 Tamaño de la muestra y población de estudio

El estudio tuvo un enfoque poblacional. Se incluyeron todos los casos disponibles que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo comprendido entre 2016 y 2023, identificados en el archivo histopatológico del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

Al analizarse la totalidad de la población accesible con lesiones melanocíticas limítrofes, no fue necesario realizar un cálculo formal del tamaño de muestra, ya que no se buscó extrapolar los resultados a una población mayor, sino estudiar de manera exhaustiva el universo de casos existentes en dicho periodo.

No obstante, como referencia metodológica, se consideraron estudios previos con objetivos similares. En el estudio de Innocenti et al. (2024), se incluyeron 88

casos de nevos displásicos en los que se evaluó la expresión de PRAME, reportándose valores predictivos del 87% para resultados negativos y del 76% para resultados positivos.

Bajo un escenario hipotético, utilizando un nivel de confianza del 95% ($Z = 1.96$), un margen de error de $\pm 10\%$ y una población finita estimada de 85 casos, se obtuvo un tamaño mínimo de muestra de 30 casos. Sin embargo, en el presente estudio se analizaron 80 casos, con el fin de fortalecer la validez interna de los hallazgos.

La población estuvo conformada por pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” que, entre enero de 2016 y diciembre de 2023, fueron sometidos a biopsias de piel con diagnóstico histopatológico en el espectro de lesiones melanocíticas limítrofes.

5.5 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión:

- Casos diagnosticados como lesiones melanocíticas limítrofes, incluyendo nevos displásicos o nevos atípicos severos, con o sin inmunohistoquímica previa.
- Pacientes atendidos durante el periodo de enero de 2016 y diciembre de 2023.
- Disponibilidad de bloques de parafina y laminillas histológicas originales en condiciones adecuadas para el estudio.
- Expediente clínico con información mínima: edad, sexo, localización anatómica, diagnóstico clínico inicial y evolución.
- Seguimiento clínico mínimo de seis meses, con información sobre recurrencia, persistencia, remisión o desarrollo de nuevas lesiones.

Exclusión:

- Casos con diagnóstico definitivo de melanoma maligno o nevo sin atipia significativa.
- Biopsias sin documentación clínica suficiente o sin validación diagnóstica institucional.
- Bloques de parafina no disponibles o deteriorados.
- Expedientes clínicos incompletos.
- Casos sin seguimiento clínico documentado mínimo de seis meses.

Eliminación

- Casos que, tras la revisión histológica, no cumplieron criterios de lesión melanocítica limítrofe.
- Muestras con artefactos técnicos significativos que impidieron una evaluación adecuada.
- Casos con discordancias graves entre observadores sin posibilidad de consenso tras revisión conjunta.

5.8 Variables del estudio

Las variables del estudio fueron seleccionadas con base en su relevancia clínica, histopatológica e inmunohistoquímica en el contexto de las lesiones melanocíticas limítrofes. Se incluyeron variables sociodemográficas, clínicas, morfológicas, pronósticas e inmunohistoquímicas, así como variables derivadas del análisis digital mediante el software QuPath.

Las variables fueron codificadas y organizadas para su análisis estadístico, lo que permitió evaluar asociaciones entre la expresión de PRAME y las características clínico-patológicas, así como su comportamiento evolutivo. La Tabla X muestra el listado de variables, su tipo y forma de codificación o medición.

Variable	Tipo	Codificación / Medición
<i>Edad</i>	Cuantitativa continua	Años cumplidos
<i>Sexo</i>	Cualitativa nominal	0 = Mujer, 1 = Hombre
<i>Localización anatómica</i>	Cualitativa nominal	Cabeza, cuello, tronco, extremidades y acrales
<i>Tamaño de la lesión</i>	Cuantitativa continua	Milímetros (mm)
<i>Diagnóstico clínico inicial</i>	Cualitativa nominal	0 = Benigno, 1 = Sospechoso/maligno
<i>Diagnóstico histopatológico</i>	Cualitativa ordinal	1 = Atipia sin displasia, 2 = Displasia de bajo grado, 3 = Displasia de alto grado
<i>Porcentaje de células PRAME positivas</i>	Cuantitativa continua	Porcentaje exacto (0–100%)
<i>Cuartil de positividad PRAME</i>	Cualitativa ordinal	0=0, 1 = >0–25%, 2 = 26–50%, 3 = 51–75%, 4 = 76–100%
<i>Intensidad de tinción PRAME</i>	Cualitativa ordinal	0 = Negativa, 1 = Débil (1+), 2 = Moderada (2+), 3 = Intensa (3+)
<i>Score combinado de PRAME</i>	Cuantitativa discreta / ordinal	Suma de cuartil + intensidad (rango 0–7)
<i>H-score (QuPath)</i>	Cuantitativa continua	Intensidad × porcentaje (rango 0–300)

<i>Concordancia interobservador</i>	Cuantitativa continua	Índice Kappa de Cohen (0–1)
<i>Evento clínico final</i>	Cualitativa ordinal	0 = Resolución, 1 = Persistencia, 2 = Recurrencia
<i>Complicaciones asociadas</i>	Cualitativa nominal	0 = Ninguna, 1 = Cicatrización, 2 = Infección, Úlcera
<i>Tiempo de seguimiento</i>	Cuantitativa continua	Meses desde la biopsia hasta el último control
<i>Nuevas lesiones melanocíticas atípicas</i>	Cualitativa nominal	0 = No, 1 = Sí

Tabla 3. Variables de estudio.

Definición y operacionalización de las variables

Las variables de atipia arquitectural y citológica se establecieron con base en los criterios morfológicos descritos en la 5^a edición del libro de clasificación de tumores de la piel de OMS, los cuales permiten estratificar las lesiones melanocíticas displásicas en displasia de bajo y alto grado.

Atipia arquitectural

La atipia arquitectural se evaluó considerando el patrón predominante, integrando los siguientes criterios estructurales: circunscripción lateral, simetría, distorsión de las crestas interpapilares, distribución y confluencia de nidos, presencia de puentes (“bridging”), diseminación pagetoide focal, compromiso suprapapilar y fibrosis lamelar concéntrica.

La variable se codificó de la siguiente manera:

0 = Atipia arquitectural leve o mínima, compatible con nevo sin displasia significativa.

1 = Atipia arquitectural moderada, caracterizada por distorsión arquitectural parcial y cambios estructurales compatibles con displasia leve a moderada.

2 = Atipia arquitectural severa, correspondiente a lesiones con pérdida marcada de simetría, distorsión de las crestas Inter papilares, mayor confluencia de nidos y cambios estructurales compatibles con displasia moderada a severa.

Atipia citológica

La atipia citológica se evaluó con base en el tamaño nuclear, la irregularidad de la membrana nuclear, el patrón de cromatina, los nucléolos prominentes y la variabilidad citoplasmática de los melanocitos.

Se clasificó de la siguiente manera:

0 = Atipia citológica leve

1 = Atipia citológica moderada

2 = Atipia citológica marcada

Estas variables se analizaron tanto de forma individual como integradas en la categorización final del grado de displasia.

Definición del score combinado

El score combinado de PRAME se utilizó como una herramienta semicuantitativa destinada a integrar la extensión y la intensidad de la expresión nuclear del marcador. Su objetivo fue estandarizar la evaluación manual de PRAME, mejorar la reproducibilidad interobservador y permitir una comparación directa con los resultados obtenidos mediante análisis digital.

El score se calculó sumando el cuartil de positividad (0-4) y la intensidad de tinción nuclear (0-3+), generando un valor final entre 0 y 7. Este enfoque permitió transformar una evaluación visual subjetiva en una variable ordinal estructurada, adecuada para el análisis estadístico y comparación con el H-score obtenido por QuPath.

5.5 Obtención de la base de datos

Se realizó una búsqueda retrospectiva en el sistema de registros digitales PATHOX, del archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario, para identificar los casos diagnosticados entre 2016 y 2023 como lesiones melanocíticas limítrofes.

Una vez identificados los casos, se revisaron los expedientes clínicos físicos o electrónicos para recabar datos relevantes como edad, sexo, localización anatómica, diagnóstico clínico inicial, conducta médica y seguimiento.

5.6 Microarreglos de tejido

Para cada caso elegible, se localizaron los bloques de parafina correspondientes en el archivo histopatológico y solo se utilizaron los que contaban con suficiente tejido representativo, de tal forma que, posterior a la realización del estudio, haya quedado material suficiente para resguardo.

Se seleccionaron cortes histológicos representativos para tinción con hematoxilina y eosina (H&E), los cuales fueron revisados con el fin de identificar las áreas más representativas de cada lesión. Posteriormente, se realizó la construcción manual de tissue microarrays (TMA) optimizados para la tinción inmunohistoquímica de PRAME.

La selección del tejido se realizó de forma individual en cada caso, marcando las áreas clave de la lesión melanocítica en los bloques de parafina. A partir de estas áreas, se realizó la extracción manual personalizada de fragmentos tisulares que incluyeron la totalidad o la porción más representativa de la lesión. El tamaño de los fragmentos varió entre 3 y 14 mm, según la extensión de cada caso. Finalmente, se incluyeron 80 muestras en 7 bloques de parafina (Fig 1)



Figura 1. Bloque de arreglo de tejidos (tissue microarray, TMA) de construcción manual utilizado en el estudio.

Los fragmentos tisulares fueron organizados y dispuestos de forma sistematizada según su tamaño, con el objetivo de favorecer un corte uniforme y estable del arreglo. Se elaboró un mapa detallado del TMA para asegurar la correcta identificación, orientación y trazabilidad de cada caso durante el procesamiento, la tinción inmunohistoquímica y el análisis posterior.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica para PRAME se realizó en cortes histológicos de 4 μm de espesor, montados en laminillas electrocargadas. Los cortes fueron procesados en una plataforma automatizada Ventana BenchMark Ultra Plus (Roche Diagnostics) siguiendo el protocolo estandarizado del proveedor.

Las laminillas fueron sometidas a desparafinización y acondicionamiento celular automático. La recuperación antigénica se realizó mediante calor utilizando el buffer Ultra CC1 (pH 9.0) durante 56 minutos. Posteriormente, se aplicó el anticuerpo primario anti-PRAME (BioSB), en una dilución 1:100, con un tiempo de incubación de 60 minutos.

El sistema de detección empleado fue OptiView DAB para tejidos en parafina, con un paso de amplificación OptiView Amplification de 4 minutos. La revelación cromogénica se realizó con diaminobencidina (DAB). Finalmente, las laminillas

se contratiñeron con hematoxilina II durante 8 minutos, seguida de Bluing Reagent durante 8 minutos.

Controles de tejido para PRAME

Con el objetivo de validar la especificidad y la adecuada interpretación de la tinción para PRAME, se incluyeron muestras de tejido de control. Como control negativo, se utilizó tejido correspondiente a un nevo intradérmico benigno, el cual mostró ausencia de tinción nuclear para PRAME, confirmando el patrón esperado en lesiones melanocíticas benignas. Como control positivo, se incluyó tejido de melanoma maligno, en el que se observó una expresión nuclear difusa de PRAME, lo que corroboró la adecuada sensibilidad del anticuerpo y la correcta ejecución del procedimiento de tinción.

Estos controles permitieron verificar la calidad técnica de la tinción en cada corrida, así como establecer referencias comparativas para la interpretación, tanto manual como digital, de la expresión de PRAME en las lesiones melanocíticas limítrofes incluidas en el estudio.

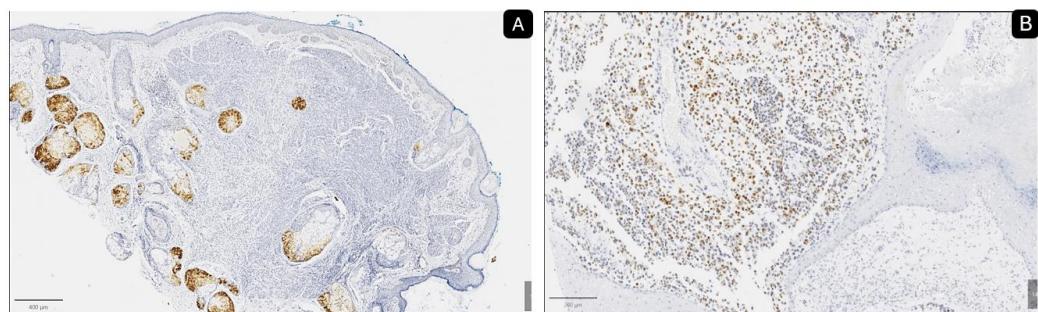


Figura 2 Tejido de control para la tinción de inmunohistoquímica de PRAME. A) Nevo intradérmico negativo con positividad para glándulas sebáceas como control interno. B) Melanoma con expresión positiva difusa en las células neoplásicas.

5.8 Evaluación manual de PRAME

Las laminillas teñidas con el marcador PRAME fueron evaluadas de manera independiente por tres observadores del servicio de Anatomía Patológica (patólogos).

La interpretación se realizó mediante un sistema semicuantitativo basado en dos componentes: el porcentaje de células con expresión nuclear positiva y la intensidad de la tinción. El porcentaje de células positivas se clasificó en cuartiles de la siguiente manera: 1 = 0–25%, 2 = 26–50%, 3 = 51–75% y 4 = 76–100%. La intensidad de la tinción nuclear se calificó como: 0 (negativa), 1+ (débil), 2+ (moderada) y 3+ (intensa).

Posteriormente, se calculó un score combinado de PRAME para cada observador mediante la suma del cuartil de positividad y la intensidad de tinción, generando un valor ordinal que permitió estandarizar la evaluación manual, reducir la subjetividad interobservador y facilitar su comparación con el análisis digital.

5.9 Digitalización y análisis de PRAME en QuPath

Las laminillas fueron escaneadas con un equipo de alta resolución (digitalizador de portaobjetos de microscopio Aperio® AT2). Las imágenes digitales se analizaron con el software QuPath (versión 0.6.0) mediante un flujo de trabajo estandarizado que incluyó la segmentación nuclear automatizada y la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de PRAME.

Para ello, se aplicó un algoritmo de detección celular con enfoque en núcleos, ajustando parámetros como el tamaño nuclear, el umbral de intensidad de hematoxilina y la exclusión de señal citoplasmática, con el objetivo de optimizar la identificación de núcleos melanocíticos y reducir los artefactos de tinción. Posteriormente, se entrenó un clasificador supervisado de células basado en características morfológicas y en la intensidad de señal, utilizando selecciones manuales representativas de núcleos positivos y negativos, el cual fue validado visualmente y aplicado de forma uniforme a todas las anotaciones.

A partir de esta clasificación, se obtuvo el H-score digital de PRAME, calculado mediante la combinación ponderada de la proporción de núcleos positivos y la intensidad de tinción nuclear (débil, moderada e intensa), lo que generó un valor continuo que permitió la comparación objetiva entre casos y su correlación con las variables clínicas e histopatológicas, así como con el score combinado.

5.10 Entrenamiento del algoritmo de análisis en QuPath

Las siguientes imágenes muestran el proceso seguido para desarrollar el algoritmo de evaluación.

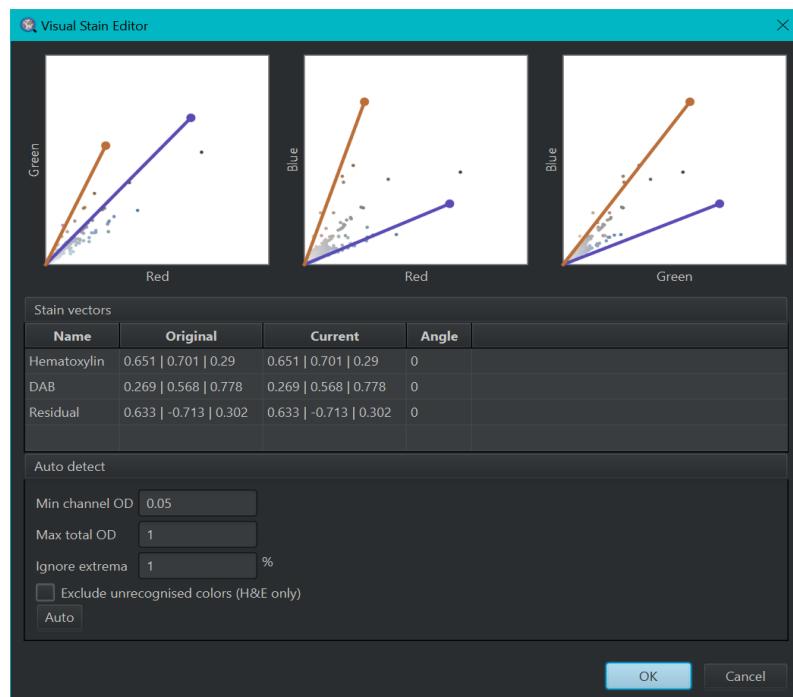


Figura 3: Separación de tinciones mediante el Visual Stain Editor, con ajuste de los vectores de hematoxilina y DAB para optimizar la detección nuclear.

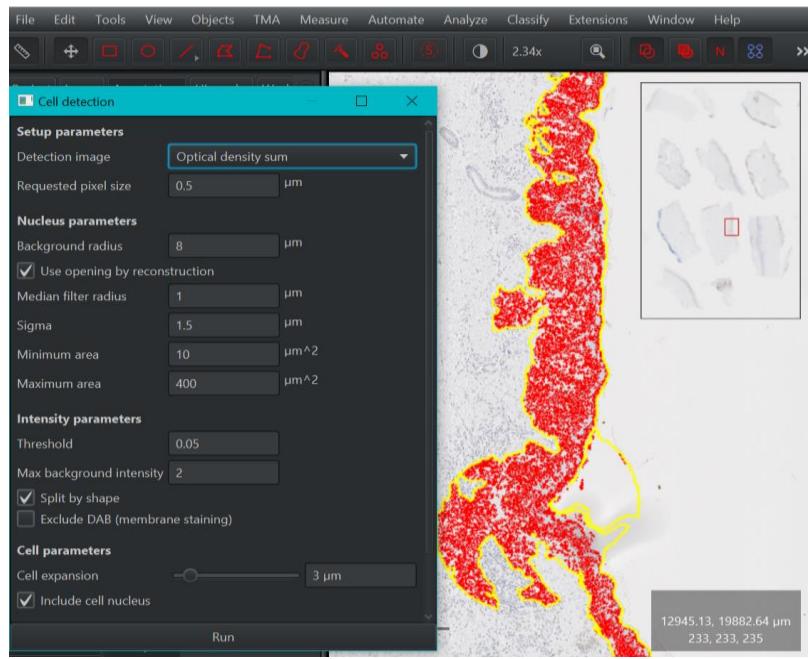


Figura 4: Configuración de los parámetros de detección celular, incluyendo el tamaño nuclear, el umbral de intensidad y la exclusión de fondo.

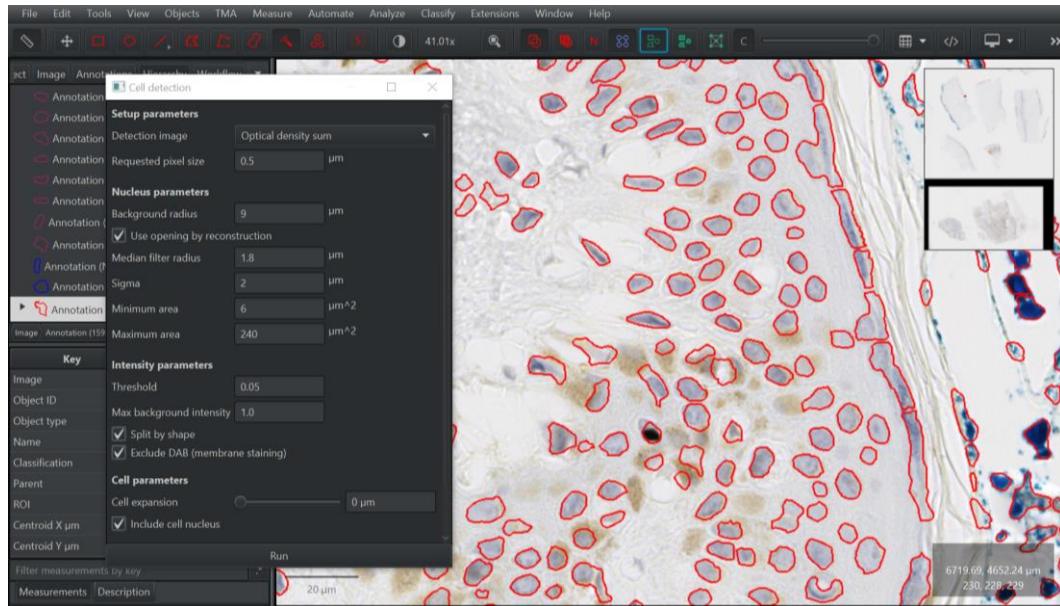


Figura 5: Configuración de los parámetros de detección celular alternativos para áreas con gran cantidad de precipitado.

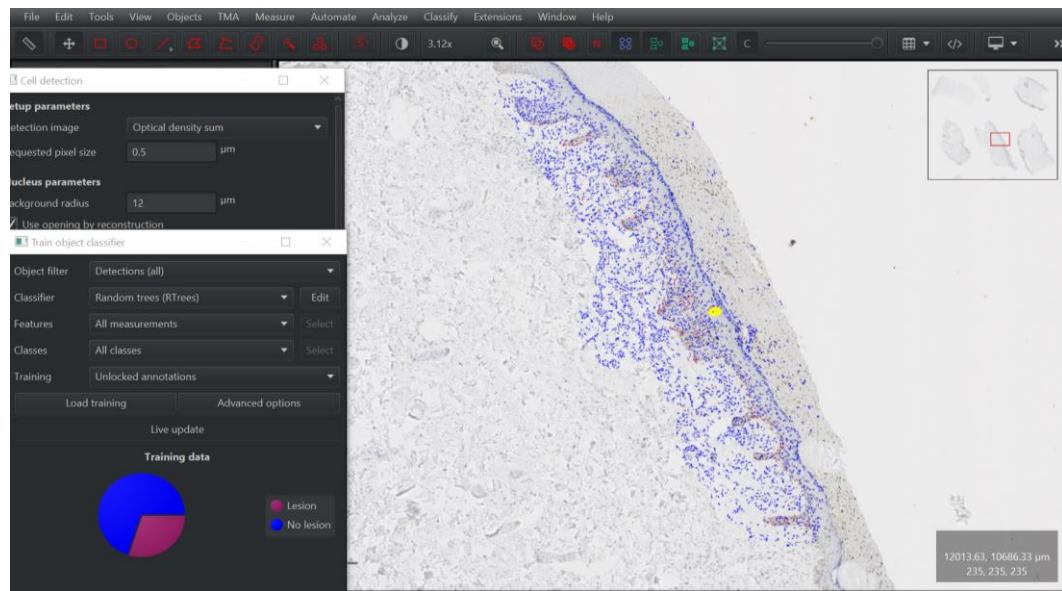


Figura 6: Anotación manual de regiones utilizadas para el entrenamiento del clasificador celular, en el que se discrimina entre células de lesión y de no lesión.

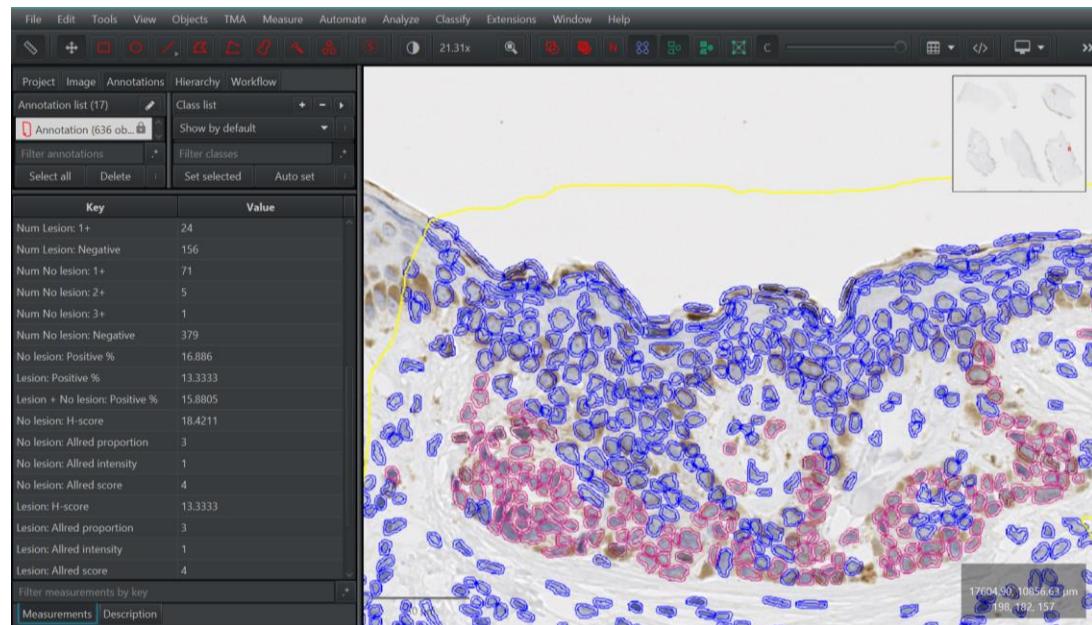


Figura 7: Aplicación de detección de intensidad DAB para identificar células con positividad por región, con obtención de porcentaje de positividad, intensidad y H-score.

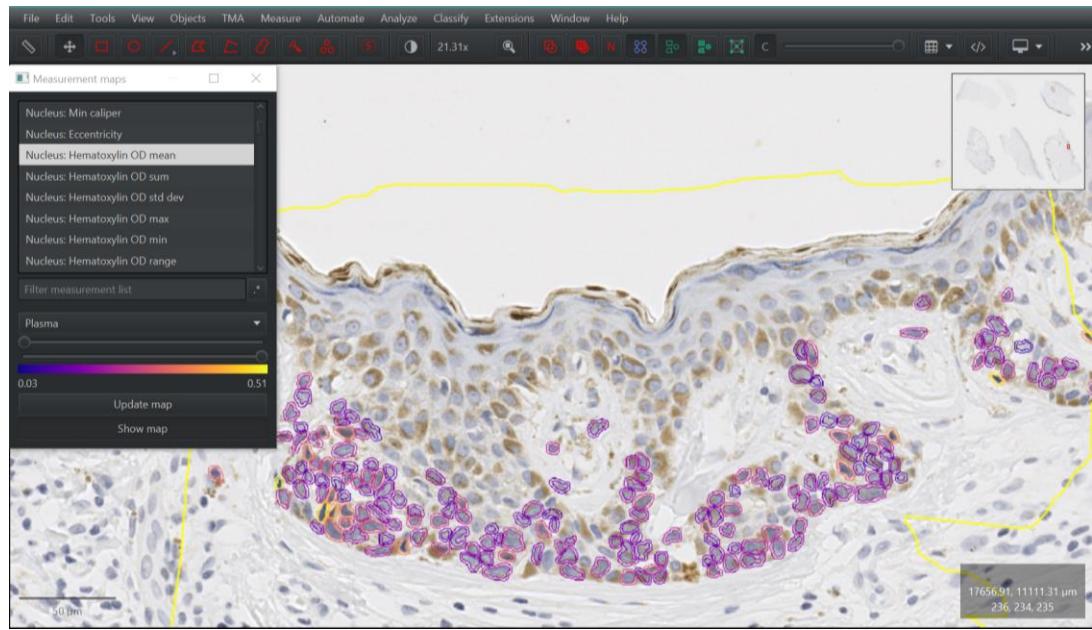


Figura 8: Mapa con discriminación de regiones con positividad nuclear y rango de intensidad por color.

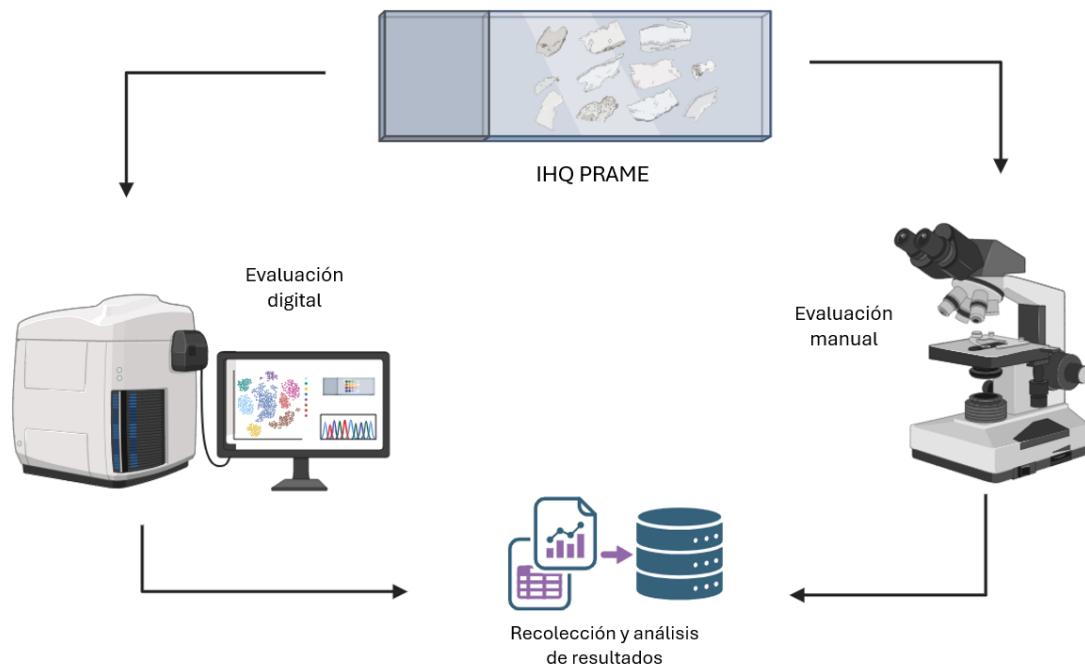


Figura 9: Diagrama de flujo de evaluación manual y digital de IHQ PRAME y análisis.

5.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión 31, estableciendo un nivel de significancia estadística de $p < 0.05$. Inicialmente, se describió la población en estudio mediante estadística descriptiva. Las variables cuantitativas se resumieron utilizando medidas de tendencia central y dispersión, expresadas como mediana y rango intercuartílico, dado que la mayoría de las variables no presentaron una distribución normal. Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y proporciones relativas.

La distribución de las variables cuantitativas fue evaluada mediante la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk, lo que orientó la selección de pruebas estadísticas no paramétricas para los análisis inferenciales.

Para evaluar la asociación entre la expresión de PRAME y las variables clínico-patológicas e histológicas, se emplearon pruebas no paramétricas. Las comparaciones entre PRAME como variable ordinal o continua (score combinado y H-score) y variables cualitativas con dos o más grupos (como grado de displasia, atipia arquitectural, atipia citológica, localización anatómica y evento clínico final) se realizaron mediante la prueba de Mann–Whitney U o Kruskal–Wallis, según correspondiera. Las asociaciones entre variables cuantitativas u ordinales, incluyendo edad, tamaño de la lesión, porcentaje de positividad de PRAME, score combinado promedio de los observadores y H-score obtenido mediante análisis digital, se evaluaron utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. La concordancia interobservador en la evaluación manual del score combinado de PRAME fue analizada mediante el coeficiente Kappa de Fleiss, adecuado para la evaluación de concordancia entre múltiples observadores. De forma complementaria, se calculó el índice Kappa de Cohen para comparaciones pareadas entre observadores. Los valores de concordancia fueron interpretados de acuerdo con los criterios propuestos por Landis y Koch. Además, se evaluó la concordancia entre la evaluación manual promedio del score combinado y el

análisis digital automatizado mediante QuPath, utilizando el coeficiente de correlación de Spearman.

No se realizaron análisis de supervivencia ni modelos multivariados, debido al tamaño de la muestra y al bajo número de eventos clínicos, por lo que el análisis pronóstico se limitó a asociaciones exploratorias entre la expresión de PRAME y los eventos clínicos registrados.

VI. RESULTADOS

Características generales de la población de estudio

Para el análisis, se incluyeron 80 casos de pacientes con lesiones melanocíticas limítrofes diagnosticadas entre 2016 y 2023 que cumplieron con los criterios de inclusión previamente establecidos, de los cuales en 66.3% fueron mujeres (n=53) y 33.8% hombres (n=27) (*Fig. 10*), con una media de 46.9 años y un rango amplio de: 16-94 años, lo que refleja una población heterogénea desde el punto de vista etario (*Fig. 11*). El 86% contaba con antecedente de lesiones melanocíticas atípicas (n=69) y el 8.8% (n=7) con antecedente de melanoma.

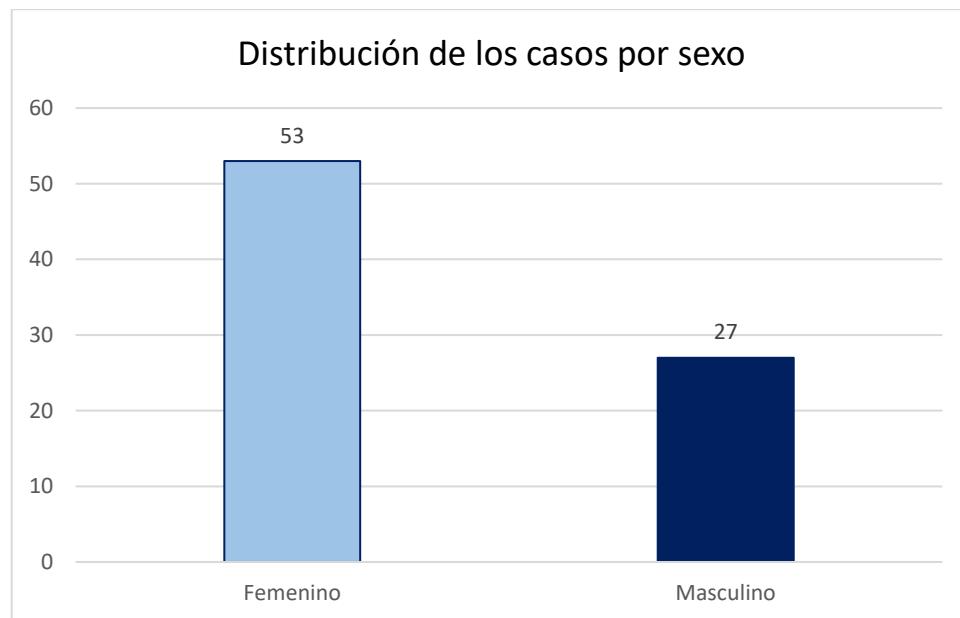


Figura 10: Distribución de los casos por sexo.

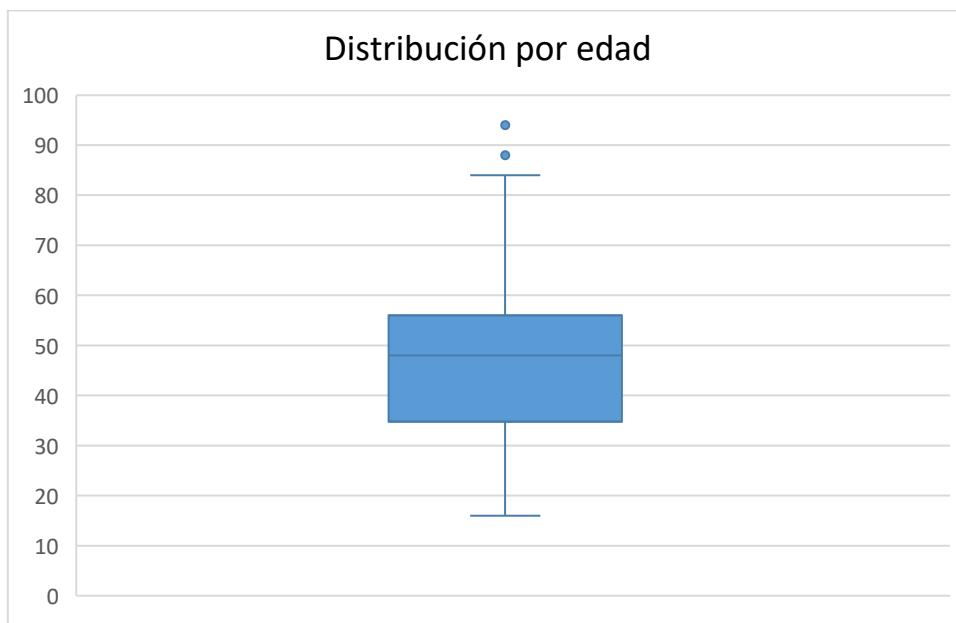


Figura 11: Distribución de los casos por edad.

El tamaño de las lesiones medidas clínicamente mostró una media de 7.23 ± 2.83 mm (rango 4.0–17.0 mm) (figura 12), mientras que el tamaño medido en la laminilla fue menor, con una media de 5.15 ± 2.53 mm (rango 2.0–12.0 mm). El tiempo de evolución clínica previo a la resección fue de 28.8 ± 16.8 meses (rango 3–60 meses), mientras que el seguimiento clínico posterior tuvo una duración de 19.35 ± 9.83 meses, con un rango de 6 a 48 meses, lo que permitió evaluar desenlaces clínicos tempranos.

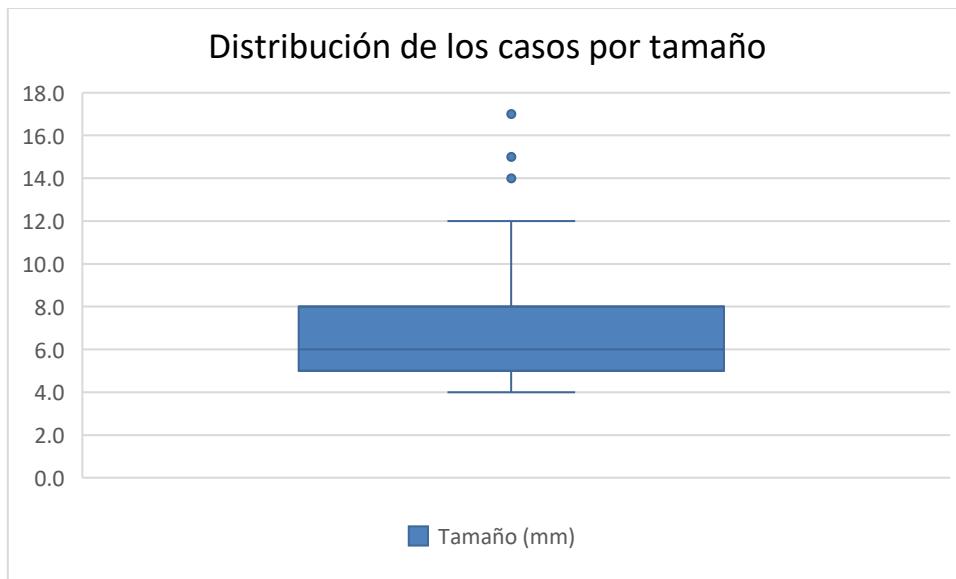


Figura 12 Tamaño: Distribución de los casos por tamaño (mm) de la lesión.

Características clínicas

La mayoría de los casos presentó asimetría (93.8%), bordes irregulares (80%) y apariencia heterogénea (87.5%). En cuanto al color, las lesiones se distribuyeron principalmente entre coloración marrón (40.0%) y una composición mixta (40.0%), con menor frecuencia de lesiones negras, azules o rojas.

El tipo clínico predominante fue la mácula (77.5%), seguido de placas (13.8%), nódulos (5.0%) y pápulas (3.8%).

Por otra parte, el 57.5% de las lesiones presentó un patrón regular, mientras que el 42.5% fue irregular y la sospecha clínica de malignidad con la que fueron enviadas las muestras para su análisis patológico estuvo presente en el 77.5% de los casos.

La localización anatómica más frecuente fue la región acral (40.0%), seguida por tronco (23.8%), extremidades (20.0%), cabeza (15.0%) y cuello (1.3%) (Fig.13).

Variable	Categoría	n	%
Apariencia	Homogénea	10	12.5
	Heterogénea	70	87.5
Color	Marrón	32	40.0
	Negro	11	13.8
	Azul	2	2.5
	Rojo	3	3.8
	Mixto	32	40.0
Tipo de lesión	Mácula	62	77.5
	Pápula	3	3.8
	Placa	11	13.8
	Nódulo	4	5.0
Asimetría	No	5	6.3
	Sí	75	93.8
Bordes	Regulares	16	20.0
	Irregulares	64	80.0
Superficie	Lisa	59	73.8
	Rugosa	21	26.3
Patrón dermatoscópico	Regular	46	57.5
	Irregular	34	42.5

Tabla 4: Características clínicas.

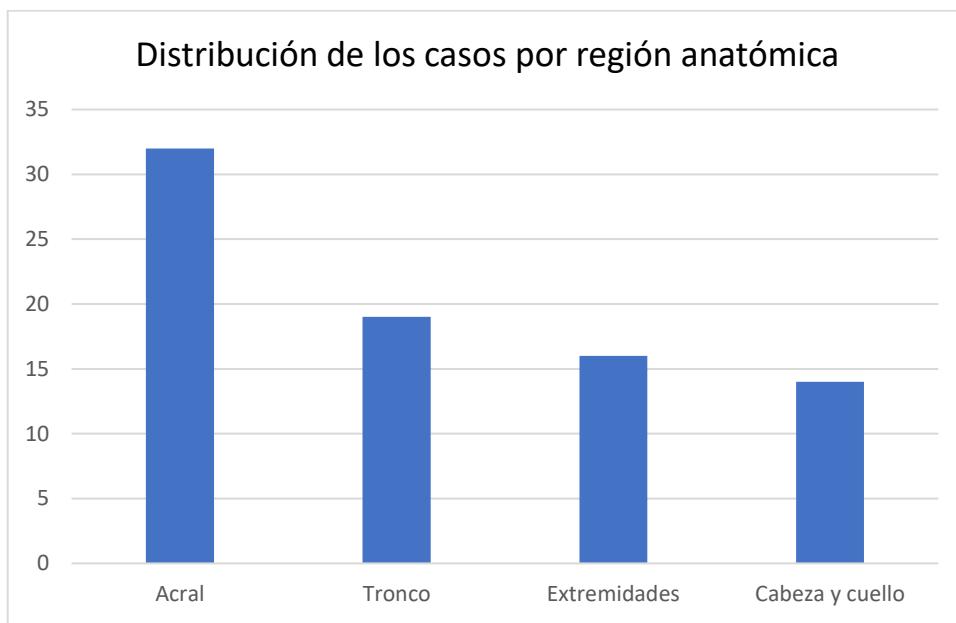


Figura 13: Tamaño: Distribución de los pasos por región anatómica.

Características histopatológicas

El 63.7% de las lesiones correspondió a nevos displásicos, mientras que el 36.3% correspondió a nevos con caracteres arquitecturales o citológicos atípicos.

La frecuencia de displasia se distribuyó de manera relativamente homogénea entre los tres grupos: sin displasia (31.3%), bajo grado (33.8%) y alto grado (35.0%).

Se observó que la atipia citológica fue predominantemente severa (51.2%), seguida de moderada (33.8%) y leve (15.0%). De forma similar, la atipia arquitectural fue mayoritariamente moderada a severa (96.3%), con un porcentaje mínimo de lesiones sin atipia o con atipia leve (3.8%).

En otros hallazgos, las mitosis estuvieron presentes en 18.8% de los casos, y la inflamación dérmica se identificó en 51.2% de las lesiones.

Variable	Categoría	n	%
Diagnóstico	Nevo con caracteres atípicos	29	36.3
	Nevo displásico	51	63.7
Atipia arquitectural	No / leve	3	3.8
	Moderada	35	43.8
	Severa	42	52.5
Atipia citológica	Leve	12	15.0
	Moderada	27	33.8
	Severa	41	51.2
Displasia	Sin displasia	25	31.3
	Bajo grado	27	33.8
	Alto grado	28	35.0
Mitosis	No	65	81.3
	Sí	15	18.8
Inflamación dérmica	No	39	48.8
	Sí	41	51.2

Tabla 5: Características histopatológicas.

En cuanto al evento clínico final, la mayoría de los casos evolucionó favorablemente. La resolución completa se observó en 73 casos (91.3%). Los eventos adversos fueron infrecuentes: la recurrencia se presentó en 2 casos (2.5%), el retraso en la cicatrización en 6 casos (7.5%) y la infección en 4 casos (5.0%). De manera global, únicamente 15 casos (18.8%) presentaron algún evento clínico adverso durante el seguimiento.

Variable	Categoría	n	%
Evento clínico final	Resolución	73	91.3
	Persistencia	5	6.3
	Recurrencia	2	2.5
Complicaciones	Ninguna	67	83.8
	Retraso cicatrización	6	7.5
	Úlcera	3	3.8
Nuevas lesiones atípicas	Infección	4	5.0
	No	65	81.3
	Sí	15	18.8

Tabla 6: Distribución del evento clínico final.

Evaluación de la expresión del PRAME

La evaluación de PRAME fue posible en 74 casos; en 6 lesiones hubo datos faltantes debido a la pérdida de tejido durante el procesamiento del tejido y la tinción

En la evaluación manual, el porcentaje de células positivas para PRAME fue bajo en general para los tres observadores. El observador 1 reportó una media de $8.18 \pm 16.57\%$, el observador 2 $5.64 \pm 15.55\%$, y el observador 3 $5.99 \pm 14.79\%$, con rangos amplios de 0 a 75% en todos los casos. En cuanto a la intensidad de la tinción, se observaron valores medios cercanos a 1+ para los tres observadores, con rangos de 0 a 3+.

Con respecto al score combinado de PRAME, que integra categorías de porcentaje de células positivas e intensidad de tinción, presentó medias similares entre los observadores (1.51–1.61), con rangos de 0 a 7, lo que indica una expresión globalmente baja a moderada en la mayoría de las lesiones.

El análisis digital mostró un porcentaje medio de células positivas mayor en comparación con la evaluación manual ($12.46 \pm 17.49\%$, rango 0–79%). La intensidad media fue de 1.57 ± 0.98 , y el score combinado digital presentó una media de 2.60 ± 1.56 .

El H-score de PRAME, calculado a partir de la distribución de intensidades (1+, 2+ y 3+), presentó una media de 24.64 ± 40.44 , con un rango amplio (0–182.6), reflejando una considerable variabilidad en la expresión de PRAME entre las lesiones.

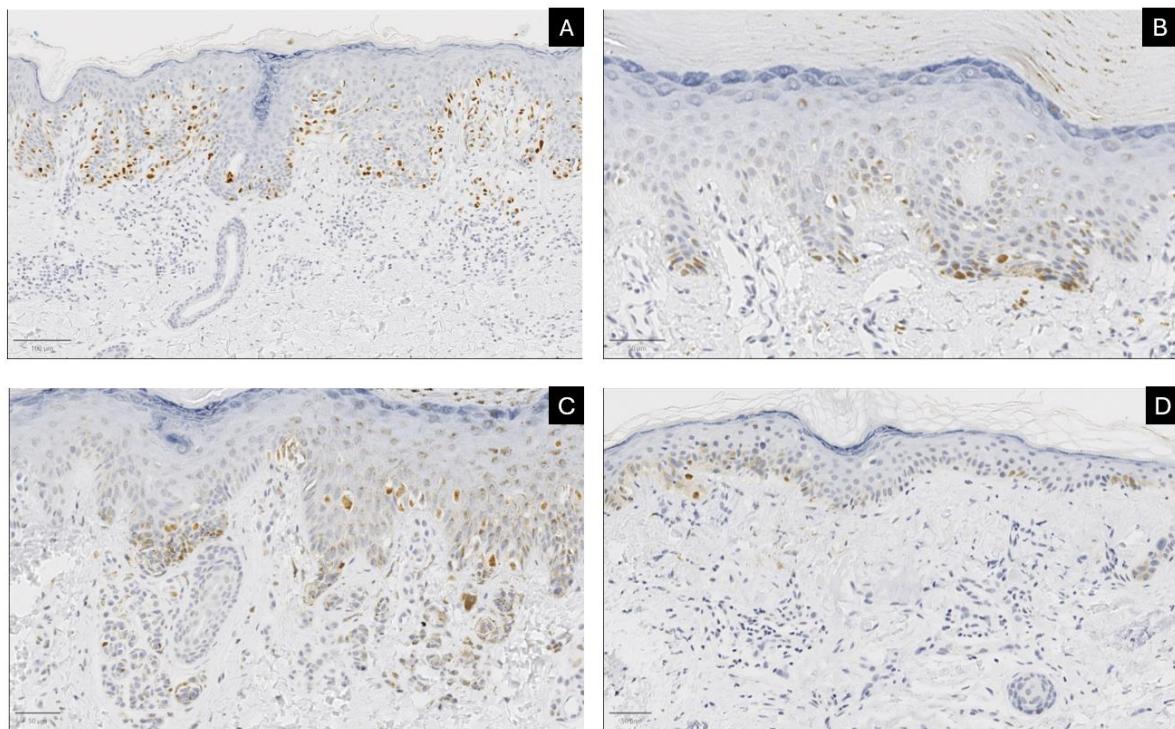


Figura 14: Variabilidad en la expresión inmunohistoquímica de PRAME 10x. A) Caso de nevo displásico de alto grado con expresión nuclear dispersa, score combinado manual: 6 y H-score digital: 169. B) Caso de nevo displásico de bajo grado con expresión nuclear parchada, en la unión dermoepidérmica, score combinado manual: 3 y H-score digital: 14.2. C) Caso de nevo displásico de alto grado con expresión nuclear parchada, score combinado manual: 4 y H-score digital: 26. D) Caso de nevo con atipia con expresión parchada mínima, score combinado manual: 2 y H-score digital: 4.6.

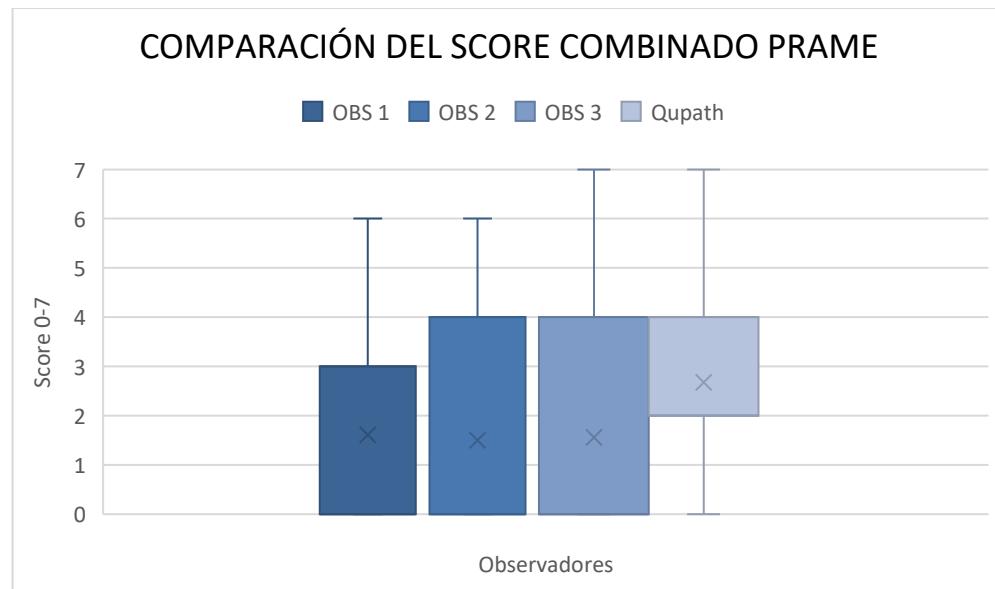


Figura 15: Comparación del score combinado de PRAME (rango 0–7) entre los tres observadores (manual) y el análisis digital mediante QuPath.

Concordancia entre observadores y análisis digital

El análisis de correlación de Spearman demostró una alta concordancia entre los observadores para el porcentaje de células positivas para PRAME, con coeficientes rho entre 0.84 y 0.97 ($p < 0.001$ en todos los casos).

Asimismo, se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la observación manual y el análisis digital mediante QuPath, con coeficientes rho entre 0.66 y 0.73 ($p < 0.001$).

De forma similar, el score combinado de PRAME mostró una correlación positiva significativa con el H-score digital, lo que indica concordancia entre la evaluación semicuantitativa manual y la cuantificación digital continua.

Asociación entre PRAME y características histopatológicas

El análisis de correlación de Spearman mostró una correlación positiva baja a moderada entre el H-score de PRAME y el grado de displasia ($\rho = 0.332$, $p = 0.004$). De forma consistente, el score combinado de PRAME de la evaluación manual también mostró una correlación positiva significativa con la displasia (por ejemplo, observador 1: $\rho = 0.302$, $p = 0.009$).

El H-score de PRAME mostró una correlación positiva significativa con la atipia citológica ($\rho = 0.334$, $p = 0.004$), evidenciando una mayor expresión de PRAME en lesiones con mayor grado de atipia citológica.

No se identificó una correlación estadísticamente significativa entre el H-score de PRAME y la atipia arquitectural ($\rho = 0.169$, $p = 0.154$).

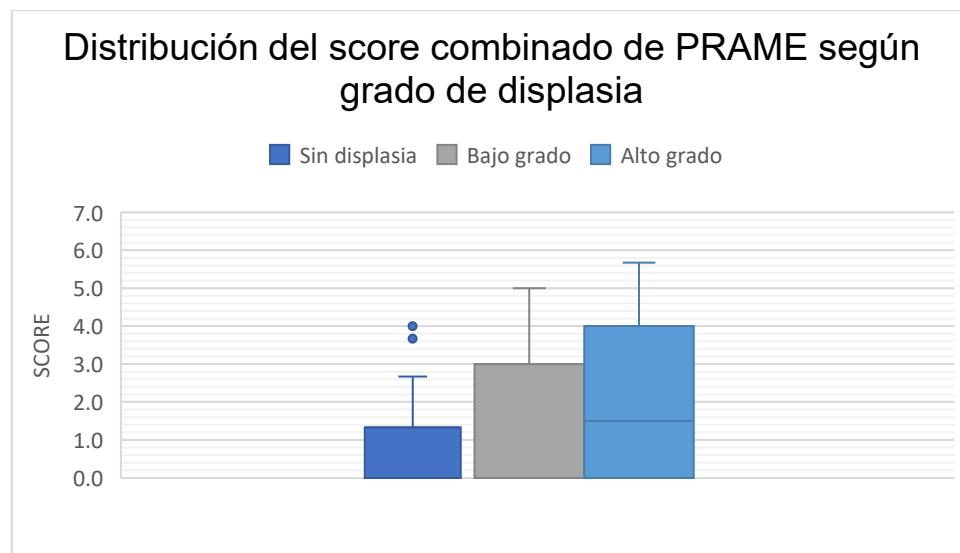


Figura 16: Distribución del score combinado manual de PRAME (rango 0–7) según el grado de displasia (sin displasia, bajo grado y alto grado).

Asociación con variables clínicas y pronósticas

La positividad extensa de PRAME ($>75\%$ de células positivas) fue infrecuente, identificándose únicamente en 1 caso (1.3%), sin ser completamente difusa.

No se observó una correlación significativa entre el H-score de PRAME y el evento clínico final (resolución, persistencia o recurrencia) ($\rho = 0.070$, $p = 0.555$), ni con el desarrollo de nuevas lesiones melanocíticas atípicas ($\rho = -0.075$, $p = 0.529$).

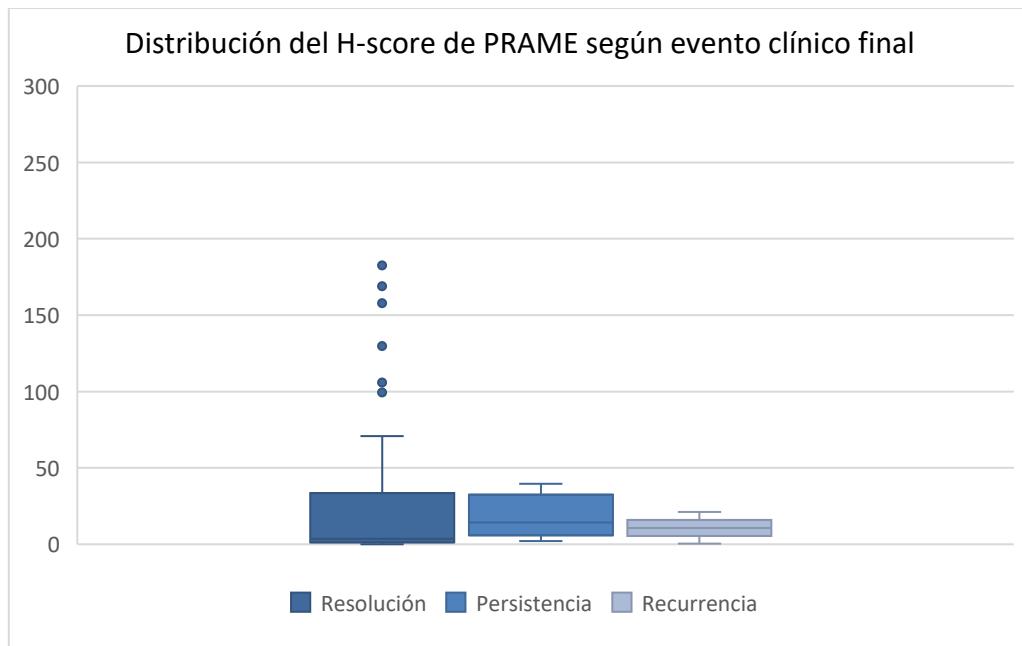


Figura 17: Distribución del H-score de PRAME según el evento clínico final.

El análisis mediante la prueba de Kruskal–Wallis mostró que el promedio del score combinado manual de PRAME presentó rangos promedio similares entre los casos con persistencia (rango medio = 4.10; n = 5) y recurrencia (rango medio = 3.75; n = 2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($H = 0.046$; $gl = 1$; $p = 0.831$).

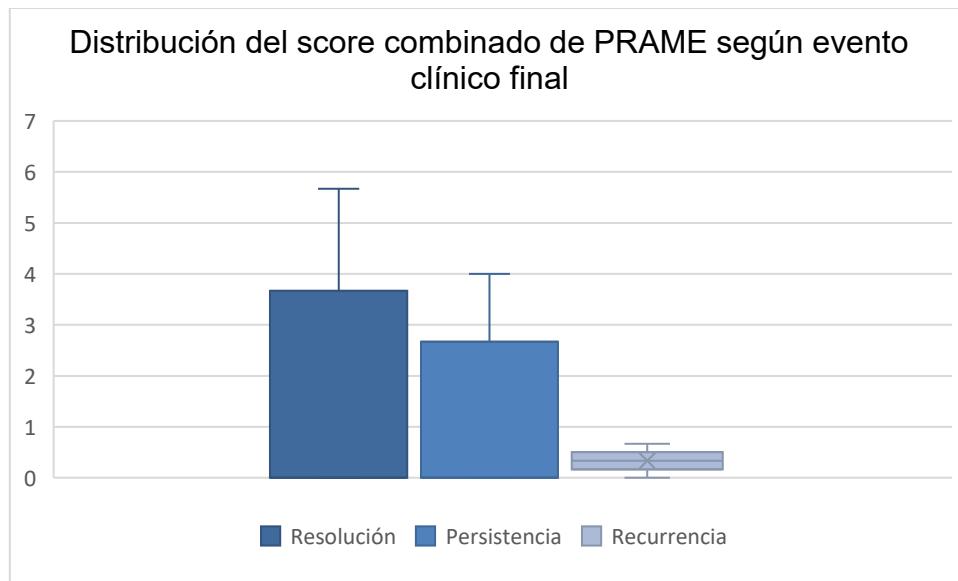


Figura 18: Distribución del score combinado manual de PRAME según el evento clínico final (resolución, persistencia y recurrencia).

En la prueba de Mann–Whitney, el promedio del score combinado manual de PRAME mostró rangos promedio similares entre los casos sin desarrollo de nuevas lesiones melanocíticas atípicas (rango medio = 37.32; n = 60) y aquellos con desarrollo de nuevas lesiones (rango medio = 38.29; n = 14). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($U = 409.0$; $Z = -0.163$; $p = 0.870$).

Análisis de la expresión por localización anatómica y dermatoscopia

El análisis no paramétrico mostró diferencias en los rangos de expresión de PRAME entre las distintas regiones anatómicas (prueba de Kruskal–Wallis) y según el patrón dermatoscópico (prueba de Mann–Whitney U); sin embargo, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Análisis de concordancia interobservador

También se evaluó la concordancia interobservador para el score combinado de PRAME (rango 0–7), mediante el índice kappa de Fleiss entre tres observadores,

la cual fue moderada ($\kappa = 0.51$). Por otra parte, la concordancia entre la evaluación manual final y el análisis digital mediante QuPath, estimada mediante el índice kappa de Cohen ponderado, fue buena ($\kappa = 0.66$), lo que indica un adecuado nivel de acuerdo entre ambos métodos de evaluación.

Variable evaluada	Método de concordancia	κ (Fleiss)	Interpretación
Score combinado PRAME (0–7)	Kappa de Fleiss (3 observadores)	0.51	Concordancia moderada

Tabla 7: Concordancia interobservador del score combinado de PRAME (rango 0–7) evaluada mediante el índice kappa de Fleiss entre tres observadores.

Comparación	Método	κ	Interpretación
Manual final vs QuPath (score 0–7)	Kappa de Cohen ponderado	0.66	Concordancia buena

Tabla 8: Concordancia entre la evaluación manual final del score combinado de PRAME (rango 0–7) y el análisis digital mediante QuPath, evaluada mediante el índice kappa de Cohen ponderado

Concordancia entre la evaluación manual y el análisis digital

Finalmente, la concordancia entre el score combinado de PRAME obtenido mediante evaluación manual y la cuantificación digital realizada con QuPath se evaluó mediante el análisis de Bland–Altman (figura 19). La gráfica mostró una distribución homogénea de las diferencias alrededor de la media, con la mayoría

de las observaciones dentro de los límites de concordancia, sin evidenciar un sesgo sistemático relevante entre ambos métodos. Estos hallazgos respaldan la consistencia entre la evaluación semicuantitativa manual y el análisis digital continuo para la valoración de la expresión de PRAME.

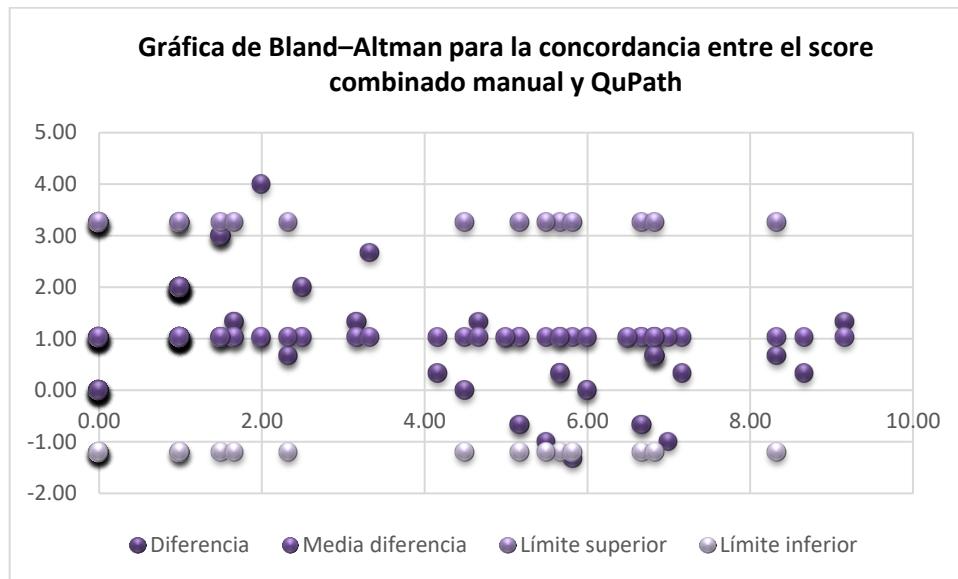


Figura 19: Gráfica de Bland-Altman que muestra la concordancia entre el score combinado de PRAME obtenido por evaluación manual y el análisis digital mediante QuPath. La línea central representa la media de las diferencias, mientras que las líneas superior e inferior corresponden a los límites de concordancia (± 1.96 DE).

VII. DISCUSIÓN

Este estudio cumplió con el objetivo de evaluar de forma estandarizada la expresión del inmunomarcador PRAME en lesiones melanocíticas limítrofes, en el que se integraron una evaluación manual por observadores expertos y un análisis digital mediante QuPath, y se correlacionaron estos hallazgos con variables clínicas, histopatológicas y pronósticas. Los hallazgos obtenidos permitieron comprender con mayor claridad el comportamiento de PRAME dentro del espectro de las lesiones melanocíticas atípicas y contribuyeron a delimitar su utilidad diagnóstica real en este contexto.

Desde el punto de vista clínico, la población estudiada mostró características heterogéneas en cuanto a edad, tamaño de la lesión y tiempo de evolución, lo cual es consistente con la naturaleza heterogénea de las lesiones melanocíticas limítrofes. Además, el hecho de que la mayoría de los casos no desarrollara nuevas lesiones melanocíticas atípicas durante el seguimiento y que los eventos clínicos adversos fueran poco frecuentes refuerza el prototipo predominantemente benigno o de bajo riesgo biológico de los casos, aun cuando en el análisis histopatológico existiera un espectro de displasia variable.

Los resultados muestran de manera consistente que la mayoría de las lesiones presentó ausencia o baja expresión del marcador PRAME, donde solo de manera excepcional se encontró una expresión más extensa con intensidad moderada, hallazgo que coincide con lo reportado en la literatura de los últimos años. Estudios como los de Lezcano et al. y más recientemente Innocenti et al. han demostrado que PRAME se expresa de manera difusa principalmente en melanomas, mientras que en nevos benignos y displásicos su expresión suele ser ausente o focal, solamente en casos muy esporádicos se ha notado un aumento en la expresión del PRAME en nevos displásicos. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que apoya la noción de que la expresión de PRAME en lesiones melanocíticas limítrofes no sigue un patrón binario benigno/maligno, sino que se distribuye a lo largo de un continuo de baja intensidad.

También se encontró una correlación positiva baja a moderada observada entre la expresión de PRAME y el grado de displasia de las lesiones melanocíticas en este estudio, lo que respalda la hipótesis de que PRAME puede reflejar un comportamiento biológico de progresión melanocítica. Sin embargo, es importante reconocer que la magnitud de dicha correlación fue limitada, lo que sugiere y apoya que el inmunomarcador PRAME no debe interpretarse como un marcador aislado de malignidad, sino como una herramienta complementaria

dentro del contexto histopatológico en el espectro histológico de lesiones melanocíticas displásicas.

Desde el punto de vista de atipia arquitectural y citológica, los hallazgos refuerzan la idea de que la expresión de PRAME tiende a incrementarse en lesiones con mayor complejidad estructural y sobre todo citológica que cumplen criterios de displasia; sin alcanzar los patrones de positividad difusa característicos del melanoma descritos en la literatura y utilizados ampliamente en la actualidad. Este hallazgo soporta la utilidad del uso de la tinción, en casos de lesiones en las que se tienen cambios citológicos o arquitecturales del espectro displásico desafiantes en la evaluación por HyE, en donde un patrón de tinción negativo o muy focal apoyaría el diagnóstico de atipia reactiva y un patrón de positividad con in score combinado leve a intermedio favorecería el diagnóstico de displasia de alto grado. Esto coincide con estudios que describen expresión focal de PRAME en nevos displásicos con displasia alto grado. No obstante, se debe tomar en cuenta que la interpretación porcentajes limítrofes o score combinado mayormente moderado, debe incluir una evaluación de la tinción muy juiciosa en la que incluso se deberá considerar el uso de otros marcadores que apoyen al diagnóstico preciso.

Por otro lado, el uso del análisis digital mediante QuPath, permitió una cuantificación objetiva de la expresión de PRAME a través del H-score, que aunque mostró detección de positividad muy baja y débil en casos donde la evaluación manual se interpretó como negativo, se preservó una buena concordancia entre ambos. Este fenómeno es esperado, ya que el sistema de análisis de imagen suele tener mayor sensibilidad de reconocimiento, como se ha demostrado en diversos trabajos anteriores que abordan el uso de análisis de imagen en patología. Además, también se redujo la variabilidad interobservador y se consolidó la reproducibilidad, lo que particularmente se vuelve relevante en este tipo de lesiones donde las diferencias suelen ser sutiles. Cabe mencionar que es crucial la selección adecuada de regiones de interés y el control en la calidad de la detección celular para la validez e implementación de estas

herramientas digitales que cada vez son más frecuentes en la patología diagnóstica.

En cuanto a las variables clínicas y pronósticas, no se identificaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de PRAME y el evento clínico final, es decir, persistencia, recurrencia o desarrollo de nuevas lesiones atípicas. Este resultado indica que el PRAME no parece tener valor pronóstico independiente, lo cual concuerda con la evidencia actual.

Entre las principales limitaciones del estudio se encuentran: su diseño retrospectivo, el tamaño de la muestra restringido y la heterogeneidad inherente a las lesiones melanocíticas limítrofes, tanto en sus características clínicas como histopatológicas. Además, es posible que la limitada información documentada en los expedientes clínicos, la variedad de las descripciones dermatológicas y el seguimiento irregular hayan contribuido a los resultados. Este punto podría corregirse en estudios posteriores en los que se contemple un formato prospectivo y mayor acuerdo en las variables clínicas. También es posible que factores de poco control en la preanalítica, como, por ejemplo, adecuada fijación y preservación del tejido, puedan interferir con la evaluación de la tinción en niveles más discretos.

Otro punto que no es una limitación sino un desafío, es que el uso QuPath requiere entrenamiento sofisticado para su implementación adecuada, es posible que exista un nivel optimizado en la programación del algoritmo de detección más alto del que se consiguió en este trabajo.

VIII. CONCLUSIONES

Nuestro estudio permitió establecer que la expresión de PRAME en lesiones melanocíticas limítrofes es predominantemente ausente o baja, y que es posible, pero infrecuente, encontrar positividad más extensa, que debe interpretarse cuidadosamente.

Se identificó una correlación positiva entre la expresión de PRAME y el grado de displasia melanocítica, lo que sugiere que el marcador refleja parcialmente el espectro de progresión melanocítica. No obstante, la magnitud de esta asociación fue limitada, por lo que PRAME no funcionó como un marcador diagnóstico o pronóstico independiente, sino como una herramienta auxiliar que debe interpretarse dentro del contexto histopatológico integral.

En cuanto al punto de vista diagnóstico, la utilidad principal de PRAME se concentró en apoyar la interpretación de lesiones displásicas complejas. Un patrón negativo o muy focal favoreció diagnósticos de atipia reactiva, mientras que una positividad leve a intermedia apoyó la presencia de displasia de alto grado, siempre en asociación con la evaluación morfológica en HyE de la lesión.

No se identificaron asociaciones significativas entre la expresión de PRAME y las variables clínicas o pronósticas evaluadas, lo que indicó que el marcador no tuvo valor predictivo para persistencia, recurrencia o desarrollo de nuevas lesiones melanocíticas atípicas.

Uno de los puntos más sólidos de este trabajo es que el análisis digital mediante QuPath demostró ser una herramienta útil para la evaluación objetiva de la expresión de PRAME mediante el H-score, mostrando buena concordancia con la evaluación manual y reduciendo la variabilidad interobservador. Además, su mayor sensibilidad permitió detectar niveles bajos de expresión, y aunque su correcta aplicación depende directamente de los parámetros de detección celular, es una herramienta auxiliar para la patología diagnóstica que promete mayor objetividad y precisión.

En conjunto, los resultados confirman que el marcador PRAME es útil como marcador complementario en la evaluación de lesiones melanocíticas limítrofes, particularmente en casos con histología desafiante, y que el análisis de imagen es una herramienta de gran utilidad que aporta objetividad en la interpretación de marcadores de inmunohistoquímica.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Elder, D. E. (2010). Dysplastic naevi: An update. *Histopathology*, 56(1), 112–120.
2. NIH Consensus Conference. (1992). Diagnosis and treatment of early melanoma. *JAMA*, 268(10), 1314–1319.
3. Elder, D. E., Duncan, L. M., Elenitsas, R., Massi, D., Mihm, M. C., Jr., & Piepkorn, M. (2023). Dysplastic naevus. In *WHO classification of tumours: Skin tumours* (5th ed., Vol. 12). International Agency for Research on Cancer.
4. Duffy, K., & Grossman, D. (2012). The dysplastic nevus: From historical perspective to management in the modern era. Part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(1), 1.e1–1.e16.
5. Mikoshiba, Y., Minagawa, A., Koga, H., Yokokawa, Y., Uhara, H., & Okuyama, R. (2019). Clinical and histopathologic characteristics of melanocytic lesions on the volar skin without typical dermoscopic patterns. *JAMA Dermatology*, 155(5), 578–584.
6. Menzinger, S., Merat, R., & Kaya, G. (2025). Dysplastic nevi and superficial borderline atypical melanocytic lesions: Description of an algorithmic clinico-pathological classification. *Dermatopathology*, 12(1),
7. Rosendahl, C. O., Grant-Kels, J. M., & Que, S. K. (2015). Dysplastic nevus: Fact and fiction. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(3), 507–512.
8. Shain, A. H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., Rickaby, W., D'Arrigo, C., Robson, A., & Bastian, B. C. (2015). The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *New England Journal of Medicine*, 373(20), 1926–1936.
9. Andea, A. A. (2021). Molecular testing for melanocytic tumors: A practical update. *Histopathology*.

10. Wiedemeyer, K., Hartschuh, W., & Brenn, T. (2021). Dysplastic nevi: Morphology and molecular aspects and the controversies in-between. *Surgical Pathology Clinics*, 14(2), 341–357.
11. Xavier-Junior, J. C. C., & Ocanha-Xavier, J. P. (2022). Dysplastic melanocytic nevus: Are molecular findings the key to the diagnosis? *Annals of Diagnostic Pathology*, 60, 152006.
12. Šerman, N., Vranić, S., Glibo, M., Šerman, L., & Mokos, Z. B. (2022). Genetic risk factors in melanoma etiopathogenesis and the role of genetic counseling: A concise review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(5), 673–682.
13. Han, W., Xu, W. H., Wang, J. X., Hou, J. M., Zhang, H. L., Zhao, X. Y., & Shen, G. L. (2020). Identification, validation, and functional annotations of genome-wide profile variation between melanocytic nevus and malignant melanoma. *BioMed Research International*, 2020, 1840415.
14. Tímár, J., & Ladányi, A. (2022). Molecular pathology of skin melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10).
15. Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., et al. (2005). BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436, 720–724.
16. Wilson, M. L. (2021). Histopathologic and molecular diagnosis of melanoma. *Clinics in Plastic Surgery*, 48(4), 587–598.
17. Spaccarelli, N., Drozdowski, R., Peters, M. S., & Grant-Kels, J. M. (2023). Dysplastic nevus part II: Molecular/genetic profiles and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 88(1), 13–20.
18. Eckerle Mize, D., Bishop, M., Resse, E., & Sluzevich, J. (2009). Familial atypical multiple mole melanoma syndrome. In D. L. Riegert-Johnson, L. A. Boardman, T. Hefferon, & M. Roberts (Eds.), *Cancer syndromes*. National Center for Biotechnology Information.

19. Shapiro, M., Chren, M. M., Levy, R. M., et al. (2004). Variability in nomenclature used for nevi with architectural disorder and cytologic atypia. *Journal of Cutaneous Pathology*, 31, 523–528.
20. Winkelmann, R. R., & Rigel, D. S. (2015). Management of dysplastic nevi. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 1056–1059.
21. Bronsnick, T., Kazi, N., Kirkorian, A. Y., & Rao, B. K. (2014). Outcomes of biopsies and excisions of dysplastic acral nevi. *Dermatologic Surgery*, 40(4), 455–459.
22. Strazzula, L., Vedak, P., Hoang, M. P., Sober, A., Tsao, H., & Kroshinsky, D. (2014). The utility of re-excising mildly and moderately dysplastic nevi: A retrospective analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(6), 1071–1076.
23. Vuong, K. T., Walker, J., Powell, H. B., Thomas, N. E., Jonas, D. E., & Adamson, A. S. (2018). Surgical re-excision vs. observation for histologically dysplastic naevi. *British Journal of Dermatology*, 179(3), 590–598.
24. Abello-Poblete, M. V., Correa-Selm, L. M., Giambrone, D., Victor, F., & Rao, B. K. (2014). Histologic outcomes of excised moderate and severe dysplastic nevi. *Dermatologic Surgery*, 40(1), 40–45.
25. Engeln, K., Peters, K., Ho, J., et al. (2017). Dysplastic nevi with severe atypia: Long-term outcomes in patients with and without reexcision. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(2), 244–249.
26. Kaczorowski, M., Chłopek, M., Kruczak, A., Ryś, J., Lasota, J., & Miettinen, M. (2022). PRAME expression in cancer. *American Journal of Surgical Pathology*, 46(11), 1467–1476.
27. Cassalia, F., Danese, A., Tudurachi, I., et al. (2024). PRAME updated. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1582.
28. Lezcano, C., Jungbluth, A. A., & Busam, K. J. (2021). PRAME immunohistochemistry as an ancillary test. *Surgical Pathology Clinics*, 14(2), 165–175.

29. Innocenti, L., Scarpitta, R., Corraro, S., Ortenzi, V., Bonadio, A. G., Loggini, B., De Ieso, K., Naccarato, A. G., Fanelli, G. N., & Scatena, C. (2024). Shedding light on PRAME expression in dysplastic nevi. *Virchows Archiv*, 485(1), 97–104.
30. Blount, S. L., Liu, X., & McBride, J. D. (2024). PRAME expression in melanocytic tumors. *Cells*, 13(20), 1740.
31. Lezcano, C., Jungbluth, A. A., Nehal, K. S., Hollmann, T. J., & Busam, K. J. (2018). PRAME expression in melanocytic tumors. *American Journal of Surgical Pathology*, 42(11), 1456–1465.
32. Hornick, J. L., Plaza, J. A., Mentzel, T., Gru, A. A., & Brenn, T. (2023). PRAME expression in dedifferentiated melanoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 47(12), 1390–1397.
33. Bahmad, H. F., Oh, K. S., & Alexis, J. (2023). Potential diagnostic utility of PRAME and p16 immunohistochemistry in melanocytic nevi and malignant melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*, 50(8), 763–772.
34. Kunc, M., Żemierowska, N., Skowronek, F., & Biernat, W. (2023). Diagnostic test accuracy meta-analysis of PRAME in distinguishing melanomas from benign lesions. *Histopathology*, 83(1), 3–14.
35. Turner, N., Ko, C. J., McNiff, J. M., & Galan, A. (2024). Pitfalls of PRAME immunohistochemistry. *American Journal of Dermatopathology*, 46(1), 21–30.
36. Fedchenko, N., & Reifenrath, J. (2014). Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry results: Semi-quantitative scoring systems including H-score and Allred score. *Diagnostic Pathology*.
37. Kurosumi, M. (2007). Review of Allred scoring system for hormone receptor evaluation in immunohistochemistry. *Breast Cancer*.
38. Kalidindi, S. (2024). The role of artificial intelligence in the diagnosis of melanoma. *Cureus*, 16(9), e69818.

39. Bankhead, P., et al. (2017). QuPath: Open-source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 7, 16878.
40. Martínez Saíd, H., Vega González, M. T., Cuéllar Hubbe, M., et al. (2023). Oncoguía de melanoma cutáneo 2023. *Latin American Journal of Clinical Sciences and Medical Technology*, 5(1), 155–167.
41. Lino-Silva, L. S., Domínguez-Rodríguez, J. A., Aguilar-Romero, J. M., et al. (2016). Melanoma in Mexico. *Annals of Surgical Oncology*, 23(13), 4189–4194.