



# **UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA**

**ORIENTACIÓN EN GENÉTICA MOLECULAR**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**“Correlación entre mutaciones en el exón 15 del  
oncogén BRAF con distintas características  
histopatológicas y la evolución clínica de pacientes  
con melanoma cutáneo en diferentes estadios”**

**ELABORADO POR: ING. MICHELLE YÉPEZ CROW**

**DIRECTOR: DR. JOSÉ MORDOH**

**CODIRECTORA: DRA. MARIANA ARIS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS**

**FUNDACIÓN CÁNCER (CIO-FUCA)**

**BUENOS AIRES, 2015**



## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Ing. MICHELLE ELIZABETH YÉPEZ CROW como requerimiento parcial a la obtención del título de MASTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA. ORIENTACIÓN EN GENÉTICA MOLECULAR.

---

Fecha

### *DIRECTORES CIENTÍFICOS*

*Director:*

*Director Adjunto:*

---

Dr. José Mordoh, MD

---

Dra. Mariana Aris, MSc

### *MAESTRANDO*

*Tesinista Maestrando:*

---

Ing. Michelle Yépez Crow

## DEDICATORIA

**La vida me enseñó que los valores y principios con los que somos educados, definen las personas que seremos y forjan gran parte del camino que seguimos. La decisión está en elegir qué hacer con el tiempo que tenemos.**

A mi madre **Isabel Crow** quien ha sido mi apoyo, fortaleza y valentía que me inspira a ser la mujer que soy.

A mi padre **Hugo Leonidas**, quien ha lo largo de mi vida me enseñó que con convicción, coraje y energía alcanzas tus sueños. *“Solo vencíéndote, vencerás”*.

A mi querido hermano **Hugo Santiago**, quien ha sido mi ejemplo de alegría, fortaleza, responsabilidad, amabilidad, guía, amigo y protector. Esto es por ustedes.

A **Dios**, por acompañarme, cuidarme, protegerme y guiarme en la aventura de mi vida.

**MICHELLE**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. José Mordoh y Dra. Marcela Barrio, por haber depositado su confianza en mí, para la realización de esta tesis, por abrirme las puertas del laboratorio y transmitirme sus conocimientos con sabiduría, pasión y alegría.

Un agradecimiento especial para la Dra. Mariana Aris por ser mi mentora, quien además de ser una excelente profesional y saber transmitir sus conocimientos de una forma clara supo ser una gran amiga.

Agradezco a las excelentes profesionales que conforman el CIO-FUCA, Pau, Ivi, Gaby, Sofi, Betu, Estefi, Estrella, Michele y especialmente a Sol Ruiz por brindarme su conocimiento con paciencia y por amor a la ciencia.

A mis Padres, hermano y cuñada, quienes me han apoyado a lo largo de mi vida con sabiduría, amor, consejos, educación y buenas energías.

A mis queridos compañeros y amigos que hice a lo largo de mi estadía en este hermoso país, Caro, Juli, Fede, Hili, Leo, Andrés, Lau, gracias por hacer mi vida más feliz.

A Dios, por la fe que puso en mí.

## RESUMEN

El melanoma cutáneo (MC) es el cáncer de piel con mayor incremento en su incidencia. Presenta alta tasa de mutaciones, siendo la más relevante la mutación nucleotídica T1799A, sustitución aminoacídica (V600E) en el oncogén BRAF. La proteína serina-treonina quinasa BRAF<sup>V600E</sup> es una variante constitutivamente activa asociada a la proliferación celular por la vía MAPK. Entre las líneas celulares de MC establecidas en nuestro laboratorio hay variantes BRAF<sup>V600E</sup> (8/16), BRAF<sup>V600K</sup> (4/16) y BRAF<sup>WT</sup> (4/16); presentando las líneas BRAF<sup>V600E</sup> mayor índice proliferativo y clonogénico *in vitro*. Trabajos recientes en pacientes con metástasis regionales de MC (estadio III AJCC) reportaron una correlación entre la presencia de BRAF<sup>V600</sup> mutado y un peor pronóstico. Este trabajo de investigación tiene el objetivo de determinar la prevalencia del *status* mutacional del oncogén BRAF<sup>V600</sup> en biopsias tumorales en una población de pacientes con MC en diferentes estadios clínico (II, III, IV), procedentes del Instituto Alexander Fleming (n=44), y su posible relación con otros parámetros clínico-patológicos. Para ello, se estableció una metodología de trabajo; desde la extracción de ADN tumoral a partir de biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina; hasta la amplificación de la región de interés y posterior análisis de su secuencia por el método de Sanger. Luego se determinó el *status* mutacional de BRAF en cada biopsia, y su relación con las características clínico-patológicas del tumor.

La población de pacientes con MC analizada presentó una frecuencia del oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado del 77%, mayor a lo reportado en bibliografía que oscila en un rango de 17-72%. De los pacientes con tumores BRAF<sup>V600</sup> mutado, se observó una prevalencia de la mutación BRAF<sup>V600E</sup> (98%), seguida de BRAF<sup>V600K</sup> (2%). Los resultados obtenidos en la población del estudio, indican que el *status* mutacional del oncogén BRAF presenta una asociación con parámetros clínico-patológicos relacionados a la progresión tumoral, como el índice de Breslow mayor a 2mm en tumores primarios ( $p=0,012$ ), la presencia de metástasis en ganglios linfáticos ( $p = 0,0036$ ) y el índice proliferativo de los tumores metastásicos ( $p = 0,0353$ ). No se encontraron asociaciones significativas con otras características clínico-patológicas ni con la evolución clínica en la población de estudio. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de considerar el *status* mutacional del oncogén BRAF como factor pronóstico, con el fin de mejorar la estadificación del MC.

**Palabras clave:** melanoma cutáneo, variables clínico-patológicas, oncogén BRAF, incidencia poblacional, factor pronóstico.

## ABSTRACT

Cutaneous melanoma (CM) is the skin cancer with the higher increase in incidence. CM presents a high mutation rate, the most relevant nucleotide mutation is T1799A, resulting in the amino acid substitution V600E, in the BRAF oncogene. The serine-threonine protein kinase BRAF<sup>V600E</sup> is a constitutively active variant associated with cell proliferation involving the MAPK pathway. Among CM cell lines established in our laboratory there are BRAF<sup>V600E</sup> (8/16), BRAF<sup>V600K</sup> (4/16) and BRAF<sup>WT</sup> (4/16) variants. BRAF<sup>V600E</sup> cell lines present greater proliferative and clonogenic index *in vitro*. Recent studies performed in patients with regional metastases (AJCC stage III) reported a correlation between the presence of mutated BRAF<sup>V600</sup> and a worse prognosis. The objective of this research was to determine the prevalence and status of BRAF mutations in tumor biopsies from a population of patients with CM in different stages (II, III, IV), all treated at the Instituto Alexander Fleming (n = 44), and their possible link with other clinico-pathological parameters. To do this, a methodology was established; DNA isolation from tumor biopsies fixed in formalin and embedded in paraffin; followed by the amplification of the region of interest and subsequent sequence analysis by the method of Sanger. Finally, BRAF mutational status of each biopsy was correlated to tumor clinico-pathologic characteristics.

The analyzed CM population presented a BRAF<sup>V600</sup> oncogene mutation frequency of 77%, higher than that reported in bibliography which varies in the range 17-72%. We observed prevalence of BRAF<sup>V600E</sup> (98 %) mutation, followed by BRAF<sup>V600K</sup> (2%). The results obtained in the study population indicate that the mutated BRAF oncogene presents an association with some clinico-pathological parameters related to tumor progression, such as a Breslow thickness >2 mm in primary tumors ( $p=0,012$ ), the presence of lymph node metastasis ( $p = 0,0036$ ); and the proliferative index of metastatic tumors ( $p = 0,0353$ ). No significant associations neither with other clinico-pathological characteristics nor with the clinical evolution were found. These results open the possibility of considering the BRAF oncogene mutational status as a prognostic factor, in order to improve staging of CM patients.

**Keywords:** cutaneous melanoma, clinico-pathological features, BRAF oncogene, population incidence, prognostic factor

**Los datos de este trabajo fueron parcialmente presentados en:**

**ESTUDIO DEL STATUS MUTACIONAL DEL ONCOGÉN BRAF EN PAICNETES CON MELANOMA CUTANEO EN DIFERENTES ESTADIOS Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.** Michelle Yépez Crow, María Marcela Barrio, Mariana Aris, José Mordoh. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) – 19 al 22 de Noviembre del 2014. Mar del Plata – Argentina.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |           |
|---|-----------|
| RESUMEN   | 5         |
| ABREVIATURAS  | 10        |
| <b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>   | <b>11</b> |
| <b>1. MELANOMA CUTÁNEO</b>  | <b>12</b> |
| 1.1. GENERALIDADES  | 12        |
| 1.2. FACTORES DE RIESGO   | 14        |
| 1.2.1. Exposición a la luz solar  | 14        |
| 1.2.2. Fenotipo cutáneo   | 14        |
| 1.2.3. Factores hormonales y reproductivos                                | 15        |
| 1.2.4. Nevus melanocítico   | 16        |
| 1.2.5. Antecedentes familiares y genéticos                                | 16        |
| 1.3. VÍAS INVOLUCRADAS EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO | 17        |
| 1.3.1. Vías de síntesis de pigmentos                                      | 17        |
| 1.3.2. Vías receptores de factores de crecimiento c-KIT                   | 18        |
| 1.3.1.1. Mutaciones en KIT  | 19        |
| 1.3.2. Vías de proliferación celular - Vía MAPK                           | 19        |
| 1.3.2.1. Mutaciones en NRAS   | 21        |
| 1.3.2.2. Mutaciones en BRAF   | 22        |
| 1.3.3. Vías de proliferación celular - Vía PI3K                           | 25        |
| 1.3.4. Vías de estabilidad genómica e inmortalidad RB Y p53               | 26        |
| 1.4. ESTADIFICACIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO                                  | 27        |
| 1.4.1. Clasificación Clínico- Patológica                                  | 27        |
| 1.4.1.1. Fase de Progresión tumoral                                       | 27        |
| 1.4.1.2. Tipo Histológico   | 28        |
| 1.4.1.3. Infiltrado Linfoide  | 30        |
| 1.4.1.4. Satelitosis Microscópica (Microsatélites)                        | 31        |
| 1.4.1.5. Índice Proliferativo   | 31        |
| 1.4.2. Diagnóstico Molecular  | 33        |
| 1.4.2.1. Técnicas Moleculares   | 33        |
| 1.5. TRATAMIENTO DEL MELANOMA CUTÁNEO                                     | 35        |
| 1.5.1. Tratamiento convencional   | 35        |
| 1.5.2. Inmunoterapia  | 35        |
| 1.5.3. Terapias dirigidas   | 37        |
| 1.5.3.1. Inhibidores de c-KIT   | 38        |
| 1.5.3.2. Inhibidores de BRAF  | 38        |
| 1.5.3.3. Inhibidores de MEK   | 40        |
| 1.6. BRAF COMO FACTOR PRONÓSTICO  | 40        |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>43</b> |
| Objetivo General  | 44        |
| Objetivos Específicos   | 44        |
| <b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                   | <b>45</b> |
| <b>2.1. MUESTRAS DEL ESTUDIO:</b>   | <b>46</b> |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.1. Identificación de las Muestras   | 46        |
| 2.1.2. Análisis Histopatológico   | 46        |
| <b>2.2. PROCEDIMIENTOS</b>  | <b>48</b> |
| 2.2.1. Microdissección Láser  | 48        |
| 2.2.2. Aislamiento de ADN   | 49        |
| 2.2.2.1. Aislamiento de ADN de biopsias de tejido tumoral de melanoma cutáneo fijadas en formol y embebidas en parafina   | 49        |
| 2.2.2.2. Aislamiento de ADN de líneas celulares   | 50        |
| 2.2.3. Determinación de mutaciones en el exón 15 del oncogén BRAF   | 51        |
| 2.2.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (NESTED –PCR)  | 51        |
| 2.2.3.2. Purificación del producto de PCR   | 54        |
| 2.2.4. Análisis de Secuencias   | 55        |
| 2.2.4. Análisis Estadístico   | 57        |
| <b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS</b>   | <b>59</b> |
| <b>3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA</b>   | <b>60</b> |
| 3.1.1. Aislamiento del tejido tumoral   | 60        |
| 3.1.2. NESTED –PCR  | 61        |
| 3.1.3. Análisis de secuenciación  | 62        |
| 3.1.4. Comparación del método de determinación de mutaciones empleado   | 63        |
| <b>3.2. ESTUDIO DE CORRELACIONES DEL ESTADO MUTACIONAL DEL EXÓN 15 DEL ONCOGÉN BRAF CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO –PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES Y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES</b> | <b>64</b> |
| 3.2.1. Características de los pacientes y su evolución clínica  | 64        |
| 3.2.1.1. Características Clínico-Patológicas de biopsias tumorales de MC  | 65        |
| 3.2.2. Frecuencia del <i>status</i> mutacional del oncogén BRAF <sup>V600</sup> en la población de estudio  | 69        |
| 3.2.3. Análisis de correlaciones entre la mutación en el exón 15 del oncogén BRAF con las características clínico-patológicas de las biopsias tumorales                                     | 71        |
| 3.2.3.1. ANÁLISIS DE TUMORES PRIMARIOS  | 75        |
| 3.2.3.1.1. Índice de Breslow  | 75        |
| 3.2.3.1.2. Ulceración   | 76        |
| 3.2.3.1.3. Índice Proliferativo en Tumores Primarios  | 76        |
| 3.2.3.2. ANÁLISIS TUMORES METASTÁSICOS  | 78        |
| 3.2.3.2.1. Metástasis en Ganglio linfático  | 78        |
| 3.2.3.2.2. Número de Ganglios linfáticos comprometidos con metástasis de MC   | 79        |
| 3.2.3.2.3. Otros Tumores Metastásicos   | 80        |
| 3.2.3.2.4. Índice Proliferativo en Tumores Metastásicos   | 80        |
| <b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>   | <b>82</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>88</b> |
| <b>ANEXOS</b>   | <b>97</b> |

**ABREVIATURAS****MC:** Melanoma cutáneo**ADN:** Ácido desoxiribonucleico**AJCC:** Comité conjunto Americano del Cáncer (*American Joint Committee on Cancer*)**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico**BRAF:** v-raf sarcoma murino viral oncogén homólogo B (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*)**CDK:** Quinasa dependiente de ciclina (*cyclin dependent kinase*)**CDKN2A:** Quinasa dependiente de ciclina 2a/p16 (*cyclin dependent kinase 2a / p16*)**C-KIT:** v-kit Hardy-Zckerman 4 sarcoma viral felino oncogén homólogo (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*)**CSF:** Factor de células madre (*stem cell factor*)**ERK:** Relación extracelular quinasa (*Extracellular-related kinase*)**FCR:** Fase de crecimiento radial**FCV:** Fase de crecimiento vertical**Fw:** Cadena *forward***gp100:** Antígenos de melanocitos linaje específicos gp100 (*Melanocytes lineage-specific antigen GP100*)**IARC:** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*)**INK4a:** Inhibidor de la quinasa 4A (*kinase inhibitor 4A*)**LMM:** Melanoma de lentigo maligno**MAPK:** Vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*)**MC1R:** Receptor 1 de la melanocortina (*melanocortin receptor-1*)**MDR:** Resistencia a múltiples fármacos (*multidrug resistance*)**MES:** Melanoma de extensión superficial**MITF:** Factor de transcripción asociado a microftalmia (*Microphthalmia-associated transcription factor*)**MN:** Melanoma nodular**MSH:** Hormona estimulante de melanocito (*melanocyte stimulating hormone*)**NRAS:** Neuroblastoma viral oncogén homólogo RAS (v-ras) (*Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*)**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa (*Phosphoinositide 3-kinase*)**RB:** Retinoblastoma**Rv:** Cadena *reverse***SI:** Sistema inmune**TIL:** Linfocitos infiltrantes de tumor (*tumor infiltrating lymphocytes*)**TKR:** Receptor tirosina quinasa (*receptor tyrosine kinase*)**UV:** Radiación ultravioleta**WT:** *Wild type*

# ***CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN***

# 1. MELANOMA CUTÁNEO

## 1.1.GENERALIDADES

El melanoma fue descrito en la Facultad de Medicina de París en el año 1806 por René Laënnac, quien discutió la “melanosis” (del griego “melas=negro”), desde entonces es considerada una patología de difícil tratamiento por su agresividad y elevada mortalidad una vez que hace metástasis (*Eddy 2003*).

El melanoma cutáneo (MC) es un tumor maligno con alta capacidad para producir metástasis, derivado de la proliferación de melanocitos atípicos, generados en la capa basal de la epidermis. Los melanocitos derivan de las células madre de la cresta neural, desde donde se extienden a las capas más superficiales y a la dermis e hipodermis en profundidad. Los melanocitos producen múltiples tipos de pigmento, la eumelanina de color marrón más oscuro y la feomelanina de color rojizo (*Zain et al 2015*). Su desarrollo está modulado por el receptor tirosina quinasa c-KIT y el MITF (Factor de transcripción asociado a microftalmi, *Microphthalmia-associated transcription factor*), que induce la transcripción de los genes de síntesis de pigmentación. Estos dos genes pueden estar mutados o amplificados en el melanoma (*Chin, Garraway, and Fisher 2006*).

Se plantean diferentes modelos para explicar la gran heterogeneidad observada en MC (*Aris M et al 2012*). El modelo de las células *stem* tumorales postula una organización jerárquica en el tumor, en donde en forma análoga a los tejidos renovables, sólo una baja proporción de células tiene potencial proliferativo ilimitado (*Boiko et al. 2010*)(*Schatton et al 2011*). Mientras que el modelo de la plasticidad fenotípica plantea con una organización más dinámica del tumor en donde el potencial proliferativo varía en el tiempo (*Quintana et al. 2008*)(*Quintana et al et al. 2010*).

El MC, es un tumor de naturaleza heterogénea tanto en tumores primarios como metastásicos, por la aparición de varios clones diferentes de células tumorales malignas. La adquisición continua de estas alteraciones puede dar lugar a la aparición de subclones del tumor con diferentes ventajas fenotípicas (por ejemplo, la invasión, proliferación, capacidad para colonizar diferentes órganos, etc.). La heterogeneidad intra-tumoral determina la presencia de más de un clon de células cancerígenas dentro de una lesión tumoral dada, y la heterogeneidad inter-tumoral, indica presencia de diferentes alteraciones genéticas en diferentes tumores metastásicos de un mismo paciente (*Yancovitz et al. 2012*).

La tasa de incidencia en MC, ha ido en aumento durante los últimos 30 años, con el riesgo de padecer melanoma en el transcurso de la vida aproximadamente de un 2% (*American Cancer Society 2014*). A pesar de que sólo el 4,6% de todos los cánceres de piel son melanoma, este tumor es responsable del 75% de las muertes relacionadas con el cáncer de piel en Estados Unidos (*Raymond L. Barnhill, Michael W. Piepkorn 2014*). La frecuencia del melanoma es 20 veces mayor en la raza blanca que en la negra. Se calcula que en el año 2015, 73.870 personas en los Estados Unidos serán diagnosticados con melanoma y que 9.940 morirán por esta causa (*American Cancer Society Inc 2015*). En el período 2007 a 2011, las tasas de incidencia para hombres y mujeres menores de 50 años de edad fueron estables, pero aumentaron 2,6% por año en mujeres mayores de 50 años. Las tasas de mortalidad disminuyeron 2,6% por año en personas menores de 50 años de edad, pero aumentaron 0,6% por año en personas mayores de 50 años de edad (*Institute National of Cancer (NCI) 2015*). En niños, el diagnóstico de melanoma es raro y su comportamiento es relativamente benigno. No hay predilección por el sexo, sin embargo la localización es diferente. En mujeres predomina en miembros inferiores, mientras que en varones predomina en tronco, cara, cuello y extremidades superiores (*Aris 2013*).

En la Argentina, se han descrito para sus diversas áreas regionales, variaciones en las tasas de mortalidad por MC. En un lapso de 20 años, se encontró que la tasa cruda de mortalidad por MC para el país en el período 1985-89, para ambos sexos, fue de 0,7 defunciones por cada 100.000 personas por año,

correspondiendo a 1.081 muertes/año. Para el quinquenio 1997-2001 la tasa cruda de mortalidad para varones fue de 1,2/100.000 personas por año y para las mujeres 0,8/100.000 personas por año. La tasa de mortalidad aumentó gradualmente, llegando para el período 2000-2004 a 1,3 defunciones /100.000 personas por año (*Latorre C., Loria F. 2011*). Es decir, la mortalidad en la población Argentina aumentó gradualmente de 1985 al 2009 con una tasa de 2,3% por año en los varones y 2,4% por año en las mujeres (*Loria, González, and Latorre 2009*).

La agresividad de este tumor y el aumento de su incidencia en la población mundial más acelerado con respecto a otros tumores, han hecho del melanoma un objetivo prioritario en los programas de prevención y salud pública de muchos países.

## 1.2. FACTORES DE RIESGO

### 1.2.1. Exposición a la luz solar

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) postuló en 1992 a la exposición a la luz solar como el principal factor de riesgo para melanoma. El melanoma se asocia principalmente con la radiación ultravioleta. Tanto los rayos UVA como los UVB dañan la piel y causan cáncer de piel. Los rayos UVB, son los principales rayos que causan las quemaduras de sol, pueden causar daño directo al ADN, y son causantes más potentes de al menos ciertos cánceres de piel hasta donde se sabe, ningún rayo UV es seguro (*Lin and Fisher 2007*)(*American Cancer Society 2014*). Las camas solares emiten radiación entre los 320 y los 400 nm (UVA) y aumentan el riesgo de incidencia de MC en 1,8 veces (*Nan et al. 2009*)(*Markovic et al. 2007*).

### 1.2.2. Fenotipo cutáneo

Corresponde a individuos de piel blanca, cabello rubio o pelirrojo, de ojos azules o verdes, con incapacidad para broncearse y que ante la exposición solar mantenida

pueden presentar una quemadura tipo A eritematosa, presentando mayor predisposición para desarrollar MC (*Markovic et al. 2007*).

Según la clasificación de Fitzpatrick (*Fitzpatrick 1988*), los fototipos cutáneos son:

- ✓ *Fototipo I*: son individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca quemaduras, sin bronceado.
- ✓ *Fototipo II*: individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca quemaduras, con mínimo bronceado.
- ✓ *Fototipo III*: individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca tanto quemaduras como bronceado.
- ✓ *Fototipo IV*: individuos de piel blanca en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado.
- ✓ *Fototipo V*: individuos de piel parda en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado.
- ✓ *Fototipo VI*: individuos de piel negra en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado.

### 1.2.3. Factores hormonales y reproductivos

Se cree que los estrógenos y la progesterona estimulan la proliferación melanocítica, ya que el uso de anticonceptivos orales y terapia de reemplazo hormonal (TRH), incrementa el riesgo de desarrollar MC (*Gandini et al. 2011*). Por otro lado se ha reportado el caso de una paciente con MC tratada con una vacuna terapéutica alogeneica, libre de progresión, hasta un tratamiento sistémico con progesterona por disfunción ovárica, lo cual condujo a la aparición de múltiples metástasis (*Mordoh, Tapia, and Barrio 2013*). Por lo tanto, el uso de la progesterona en pacientes con MC que están en tratamiento inmunológico (inmunoterapia) debería ser revisado cuidadosamente, ya que la progesterona puede modificar el balance pro-inflamatorio y las funciones Th1 del sistema inmune a un perfil anti-inflamatorio y regulatorio (tolerogénico), con impacto en la progresión tumoral.

#### 1.2.4. Nevus melanocítico

Los nevi melanocíticos o lunares son acumulaciones benignas de melanocitos o células de nevus y pueden ser congénitas o adquiridas. El riesgo de melanoma varía sobre la base del tipo, tamaño, número, y localización de nevi. En aproximadamente el 50% de los casos, el melanoma se produce en conjunción con un nevus preexistente (*Balch et al. 2009*) (*Markovic et al. 2007*). El riesgo de melanoma se ha correlacionado directamente con el número total de nevi benignos (tanto displásicos y no-displásicos) en el cuerpo. La presencia de nevi displásicos es un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples melanomas primarios, se consideran marcadores de riesgo y precursores directos de melanoma. El nevus displásico es producido por un conjunto de lesiones clínicas e histológicas que se heredan de forma autosómica dominante, éstos suelen ser más grandes que otros lunares (al menos 0,5 cm de diámetro), bordes oscuros, irregularmente pigmentados e indefinidos (*Lynch, Fritchot, and Lynch 1978*)(*Greene et al. 1985*)(*Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio 2013*).

#### 1.2.5. Antecedentes familiares y genéticos

La mayoría de los melanomas cutáneos aparecen como consecuencia del efecto de factores ambientales y no son parte de un síndrome hereditario. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los casos presenta agrupaciones familiares y toma valor cuando los afectados son parientes de primer grado, doblando el riesgo de padecer melanoma, siendo esta característica el riesgo individual más significativo de esta enfermedad. Algunas familias con melanoma hereditario demuestran un claro patrón de herencia autosómica dominante con varios miembros de la familia afectados en más de una generación. El gen que más se ha estudiado, por desempeñar un papel predominante en el desarrollo neoplásico, gen CDKN2A (quinasa dependiente de ciclina 2a/p16, *cyclin dependent kinase 2a / p16*) o p16INK4a, localizado en la banda p21 del cromosoma 9. Este gen se encuentra alterado con mucha frecuencia en pacientes con presentación familiar y también en las líneas celulares de melanoma. Este gen codifica proteínas relacionadas con el control del ciclo celular (*Markovic et al. 2007*) (*Desmond R. 2003*). El melanoma se conoce que tiende a agruparse en familias con síndromes de



cáncer familiar, como el retinoblastoma familiar, síndrome de cáncer Li-Fraumeni y Síndrome de Lynch tipo II (Markovic et al. 2007).

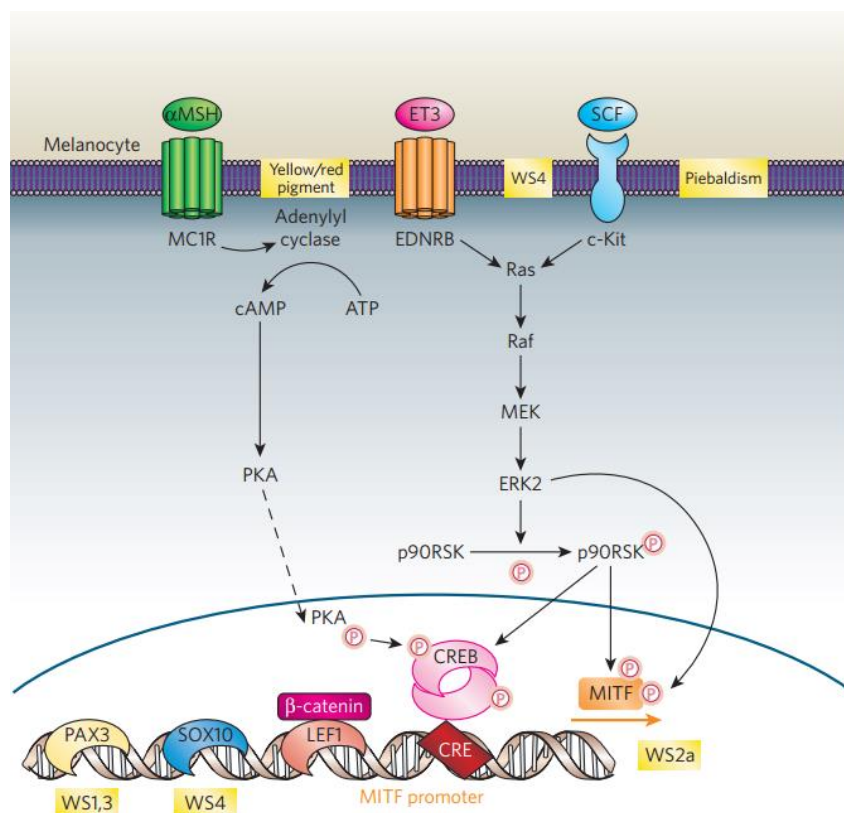
### 1.3. VÍAS INVOLUCRADAS EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO

El desarrollo del melanoma desde un melanocito sigue una serie de procesos en los que se acumulan alteraciones genéticas. Aunque esto no ocurre en todos los casos en forma sucesiva, los estadios progresivos se puede iniciar con el desarrollo de un nevus melanocítico, pasando por un nevus displásico, pudiendo dar lugar a un melanoma *in situ* (Botella-Estrada and Sanmartín Jiménez 2010).

#### 1.3.1. Vías de síntesis de pigmentos

La señalización pro-pigmentación se inicia por la unión de la ( $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone) al receptor melanocortina 1 (MC1R). El gen MC1R está localizado en el extremo telomérico del cromosoma 16q24.3. MC1R es un receptor transmembrana en la superficie celular de los melanocitos acoplado a proteína G que activa la estimulación de adenilato ciclasa, lo que conduce a un aumento de los niveles de AMPc intracelulares y expresión de (MITF, *Microphthalmia-associated transcription factor*) (Figura 1.2.). MITF a su vez induce la transcripción de los genes específicos de melanocitos como gp100, “SILV, *melanocyte-specific genes silver homologue*”, “Melan-A, MLANA” y tirosinasa; además estas proteínas son antígenos prototipo en MC (Aris M et al 2012). Este factor MITF, es el gen encargado del desarrollo y la diferenciación de los melanocitos; y favorece la supervivencia de los melanocitos con el incremento en la expresión de los factores antiapoptóticos BCL2 y BclxL (Botella-Estrada and Sanmartín Jiménez 2010)(Lin and Fisher 2007). Aunque muchos loci están implicados en la pigmentación humana, MC1R es un determinante importante del fenotipo pigmentación, constituye uno de los genes identificados que explica una parte sustancial de la variación fenotípica humana. Ante la diversidad, se estableció por consenso entre los resultados de varios grupos de trabajo acerca de cuál era el

alelo más frecuente, “*wild type*”. Se han descrito alrededor de 30 variantes alélicas hasta ahora, en las que tres (Arg151Cys, Arg160-Trp, Asp294His) se encuentran asociadas a la presencia de pelo rojo, piel clara, ausencia de capacidad para broncearse y una gran predisposición para desarrollar lentigos solares. Los polimorfismos en MC1R implican sustituciones de aminoácidos individuales que pueden reducir la señalización de MC1R, resultando en la pérdida de producción del pigmento eumelanina; por lo que sólo se sintetiza el pigmento feomelanina, produciendo un fenotipo de la piel / pelo rojo. Además, la feomelanina en exceso produce metabolitos que se cree son mutagénicos y citotóxicos, que pueden aumentar aún más el riesgo de MC (Nan *et al.* 2009).



**Figura 1.2.** Vía de síntesis de pigmentación, donde la hormona  $\alpha$ -MSH se une al receptor MC1R y activa la estimulación de adenilato ciclasa aumentando la producción de cAMP. El promotor MIF está regulada en parte por los factores de transcripción PAX3, SOX10, LEF-1 / CRE y CREB durante el desarrollo de los melanocitos. Imagen adaptada de (Zain *et al* 2015).

### 1.3.2. Vías receptores de factores de crecimiento c-KIT

El proto-oncogén c-KIT se encuentra codificado en el cromosoma 4q11-12, cerca del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), y codifica para una glicoproteína

transmembrana que actúa como receptor de tirosina quinasa, cuyo ligando es el CSF (factor de células madre), un factor de crecimiento fundamental en la hematopoyesis y en la formación de otros tipos de células, como los melanocitos, importante para la migración, proliferación, adhesión, apoptosis y diferenciación celular. La expresión de C-KIT es inhibido por miR-221 (micro ARN: ARN cortos que modulan la expresión post-transcripcional de proteínas) (*Handolias D et al. 2010*) (*Botella-Estrada and Sanmartín Jiménez 2010*).

### 1.3.1.1. Mutaciones en KIT

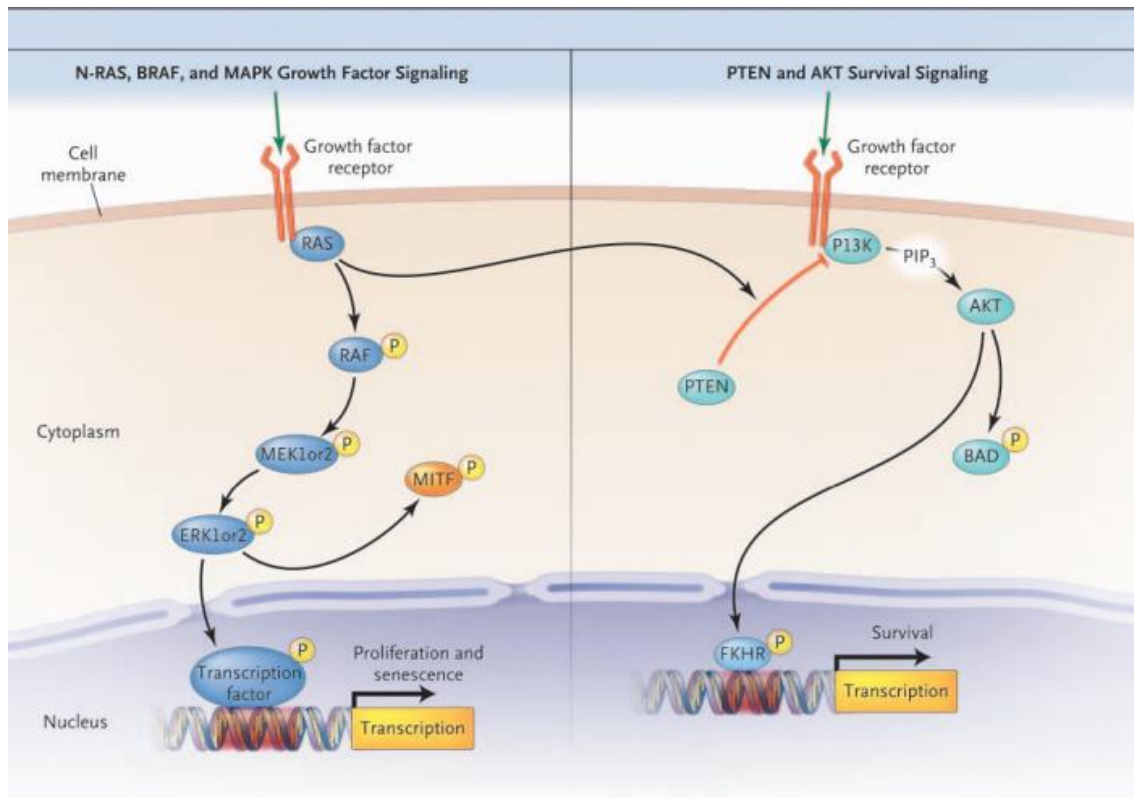
KIT es un receptor de tirosina quinasa y está mutado en un pequeño porcentaje de melanomas cutáneos (10-39%). Sin embargo, en los melanomas lentiginosos de las mucosas la prevalencia de mutación en KIT presenta un rango del 15 al 20% y en melanoma acral del 10 al 20%, donde el principal factor de riesgo es la exposición crónica al sol (*Genetically informed Cancer Medicine 2015*). Las mutaciones somáticas en KIT se han observado en diferentes exones, incluyendo 9, 11, 13, y 17. Como no hay una única mutación predominante en KIT, las pruebas moleculares deben evaluar múltiples exones dentro del gen, en búsqueda de las mutaciones más destacadas en pacientes con MC. Varias respuestas se han observado en pacientes con MC cuando son tratados con imatinib, el cual es un inhibidor de tirosinas quinasas como KIT y PDGFR. Además se ha observado que la respuesta máxima a imatinib se observa en pacientes cuyos melanomas presentan mutaciones de KIT en los exones 11 y 13. Otros estudios se han realizado para tratar las mutaciones de KIT en MC mediante la droga dasatinib, que es otro inhibidor de tirosina quinasa, aunque los efectos observados son similares a los generados por imatinib (*Wilson A and Nathanson 2012*). Aproximadamente el 30% de los melanomas no contienen mutaciones en BRAF, NRAS, o genes KIT, por lo tanto actualmente no tienen la posibilidad de ser tratados con terapias dirigidas (*Lemech, Infante, and Arkenau 2012*).

### 1.3.2. Vías de proliferación celular - Vía MAPK

Una de las alteraciones moleculares presentes en un mayor número de melanomas implica a la vía de señalización MAPK (proteína quinasa activada por

mitógenos), debido a que interviene en la proliferación, supervivencia e invasión celular. Las mutaciones de los diferentes componentes de esta vía varían según el subtipo clínico de melanoma. Esta vía de señalización intra y extracelular incluye cuatro quinasas: RAS, RAF, MEK y ERK. En los melanomas, se han detectado mutaciones en las quinasas NRAS en el 20% de los casos, mientras que mutaciones en B-RAF (oncogén v-raf sarcoma murino viral homólogo B, *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), un miembro de la familia RAF, se encuentran aproximadamente en un 40 a 70% de los casos clínicos (Barbour et al. 2014) (Tschandl et al. 2013) (Venesio et al. 2008) (Picard et al. 2014) (Aris and Barrio 2015).

En condiciones fisiológicas, la vía MAPK se activa en respuesta a la unión del ligando al receptor de tirosina quinasas o receptores de citoquinas (TKR) o con integrinas. La dimerización del receptor desencadena su actividad quinasa intrínseca, autofosforilando residuos de tirosina, específicos de la porción intracelular de dichos receptores. Estos receptores auto-fosforilados conducen a la activación de miembros de la familia Ras, proteínas G monoméricas que actúan como proteínas de conmutación GTPasa, mediante el reclutamiento de pequeñas proteínas adaptadoras citosólicas como Grb-2 que se asocian con Sos (factor intercambiador de nucleótidos guanina-RAS) y convierte la proteína RAS, de RAS-GDP inactivo a RAS-GTP activo. RAS-GTP promueve la formación de complejos de transducción de señales y activa a los miembros de la familia RAF (c-RAF1, ARAF y BRAF), disparando una fosforilación secuencial, y por ende la activación de la cascada de serina / treonina quinasas, activando Mek1 y Mek2 que culminan en la activación de ERK (Figura 1.3.) (Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio 2013). ERK es una serina treonina quinasa que puede fosforilar muchos blancos, tales como otros factores de transcripción, debido a que se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes relacionados con la regulación del crecimiento tales como c-fos y c-jun. Estos dos factores forman un complejo llamado AP1, que se une al ADN mediante secuencias consenso. AP1 controla la proliferación regulando la expresión de ciclinas D1 y de proteínas reguladoras e inhibidoras como p21, p19 y p16 (Zain et al 2015).



**Figura 1.3.** La vía MAPK es una cascada de transducción de señales que incluye al NRAS-BRAF - MEK y al ERK. Esta cascada comienza con la activación de receptores de membrana tirosin-quinasa (TKR), por varios factores de crecimiento que activan al RAS. Éste a su vez activa a los miembros de la familia RAF, y dispara una fosforilación secuencial, y por ende activación de las quinasas MEK y de las quinasas ERK 1 y 2. Las ERK1/2 se translocan al núcleo y conducen a la activación de los factores de transcripción de varios genes e interactúan con otras vías, incluyendo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y MITF. Imagen adaptada de (*J. Miller 2006*).

Las mutaciones activadoras en los miembros de la familia RAS han demostrado ser una vía de la señalización celular para la proliferación y transformación maligna de tumores. La señalización de esta vía se encuentra activa en casi todos los melanomas (*Davies et al. 2002*)(*Zain et al 2015*).

### 1.3.2.1. Mutaciones en NRAS

Las mutaciones predominantes en NRAS en MC se producen en el exón 2 del gen, en el codón 61 con la sustitución de la glutamina con varios aminoácidos diferentes (Q61), lo que resulta en la activación constitutiva que conduce a la proliferación celular. Estas mutaciones en NRAS son las segundas mutaciones más prevalentes, y se encuentran en 15- 20% de los melanomas (*Greene et al. 2009*).

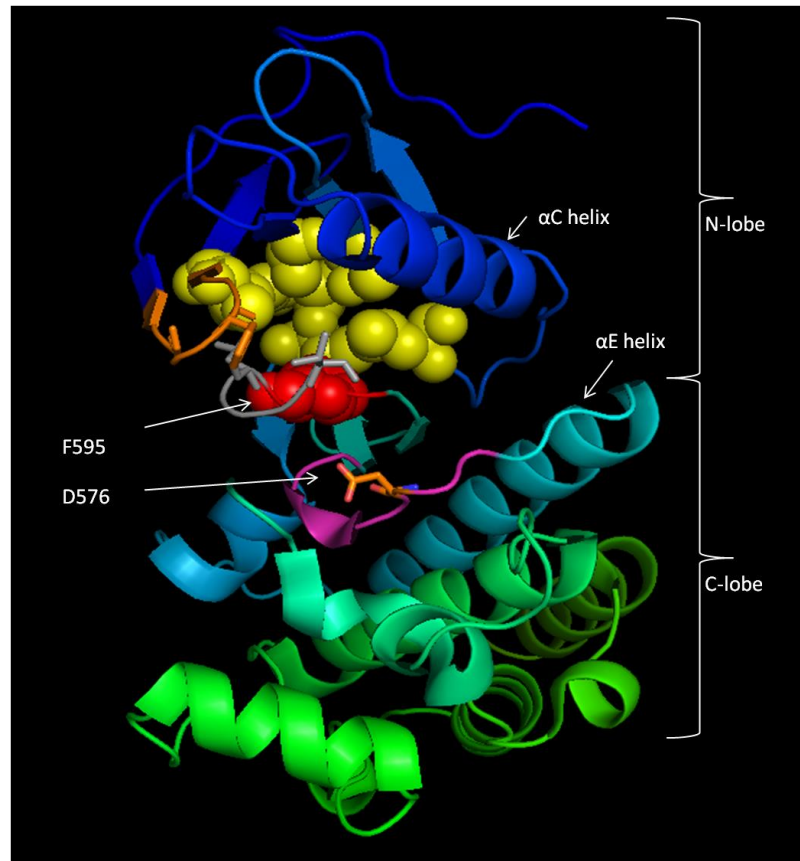
Además, se han identificado mutaciones somáticas en el exón 1 en los codones G12 y G13. Las mutaciones Q61 de NRAS se asocian con el subtipo nodular de melanoma, un aumento del grosor del tumor (índice de Breslow), y peor evolución clínica, con menor tiempo de supervivencia específica en melanoma (*Carlino M et al. 2014*). En general, las mutaciones en NRAS son excluyentes con las mutaciones en BRAF.

### 1.3.2.2. Mutaciones en BRAF

El gen BRAF, identificado como un oncogén prevalente en MC en el año 2002 (*Davies et al. 2002*), ha sido objeto de estudio desde entonces como blanco para el desarrollo de terapias dirigidas, usando inhibidores específicos de la quinasa de BRAF. En la vía MAPK, el oncogén v-Raf sarcoma murino viral homólogo B1 (BRAF) es el blanco genético dominante en esta vía, con un 40-70% de los melanomas con una mutación somática en este gen (*Cheng, P. Chu, M. Hinshaw, K. Smith, J. Maize 2011*)(*Picard et al. 2014*)(*Inumaru et al. 2014*).

BRAF es una proteína serina / treonina quinasa, codificada en el cromosoma 7q34, perteneciente a la familia RAF. Esta familia se compone de 3 isoformas quinasa, ARAF, CRAF (RAF-1), y BRAF, estas activan la vía de señalización MAPK / ERK (*Lemech, Infante, and Arkenau 2012*). Cuando las señales extracelulares interactúan con sus receptores activan a RAS, este actúa a través de proteínas adaptadoras para activar y reclutar proteínas RAF a la membrana celular donde se activan (dominio CR1), produciéndole un cambio conformacional y promoviendo cambios en el estado de fosforilación y activación de su actividad quinasa. La proteína RAF contiene tres regiones conservadas, CR1, CR2 y CR3. CR1 y CR2 son dominios regulatorios. CR3 comprende el dominio quinasa, que a su vez contiene dos regiones importantes para la activación RAF, el segmento de activación y la región reguladora cargada negativamente (región-N). La región-N contiene un motivo SSYY (S<sup>338</sup>SY Y en CRAF y S<sup>298</sup>SY Y en ARAF), que también están sujetos a fosforilación, el primero y último residuo de serina y tirosina de este motivo en CRAF y ARAF deben ser fosforilados para la activación. BRAF no requiere de esta fosforilación adicional en su dominio N-región, para la activación completa, porque el residuo de serina S446 en BRAF está

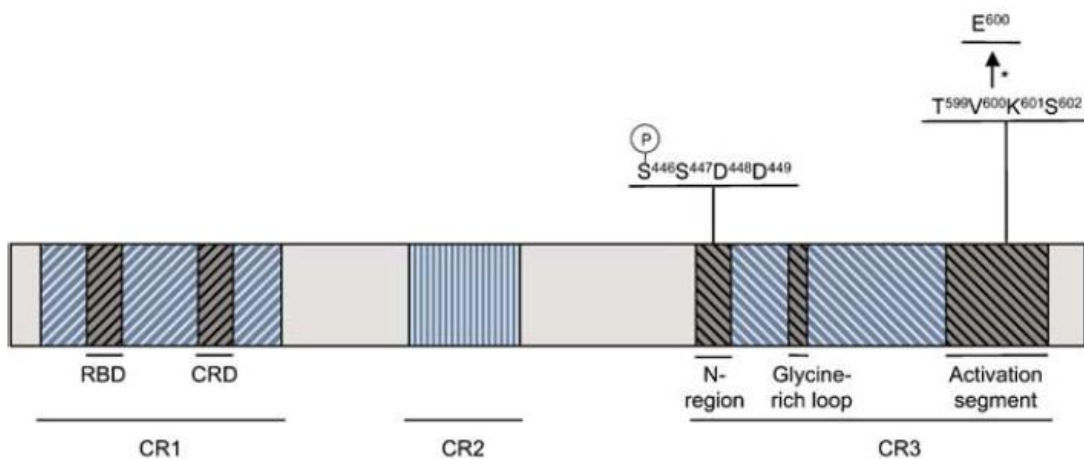
fosforilado constitutivamente y en lugar de los residuos de tirosina en BRAF el ácido aspártico (D448D449), actúa como una serina tirosina fosforilada, contribuyendo de esta manera a la predominancia de la isoforma BRAF en la activación de MEK. (Figura 1.4.) (Davies et al. 2002) (Chrysiis Michaloglou et al. 2005)(Huang, Zhuge, and Zhang 2013)(Wong 2009).



**Figura 1.4.** Estructura conformacional de la proteína BRAF inactiva. *P-Loop* (naranja), interacciones hidrofóbicas con bucle de activación residuos (gris), que estabilizan la conformación quinasa inactivos se representan con palos. F595 (rojo) bloquea el bolsillo hidrofóbico donde se une la adenina ATP (amarillo). D576 (naranja) se muestra como parte del bucle catalítico (magenta). Imagen adaptada de (RCSB Protein Data Bank (PDB) 2015).

El dominio BRAF quinasa tiene una estructura característica bilobal, con pequeños y grandes bucles (*loop*), separados por una hendidura catalítica. En la conformación inactiva de BRAF, los motivos conservados de aspartato, fenilalanina y glicina (DFG), que se encuentran en el dominio de activación, muestran una conformación volteada que orienta la región de la activación hacia la *P-bucle* de la *N-lóbulo*. Esto trae residuos ricos en segmentos de glicina G595-V600 cerca de los residuos G463-V470 del exón 11, que permite a las interacciones hidrofóbicas que se formen entre estos segmentos. Esto se traduce en una orientación conformacional que

hace que la hendidura catalítica sea inaccesible. En esta conformación inactiva, los residuos requeridos para las reacciones de fosfo-transferencia están alineados, pero los segmentos de reconocimiento de ATP y sustrato peptídico están parcialmente desorganizados (Cantwell-Dorris, O'Leary, and Sheils 2011). Por lo tanto, todo lo que se requiere para la transición a un estado activo es un cambio en la posición del motivo DFG. La activación por mutaciones tiende a agruparse en el bucle de activación y segmentos ricos en glicina y, a menudo se encuentran en los residuos que normalmente estabilizan las interacciones entre estas regiones. La secuencia mutada en el exón 15, BRAF<sup>V600E</sup> sustituye a valina V600, una cadena lateral hidrófoba de tamaño medio que interactúa con F467 fenilalanina de la P-bucle, con glutamato de carga negativa, una cadena lateral más grande. V600 se encuentra en el segmento de activación cerca del motivo DFG. La sustitución V600E interrumpe la interacción hidrofóbica y la desestabilización de la conformación que mantiene la orientación inactiva del motivo DFG, lo que resulta en la restitución del motivo DFG a su estado activo y restaurando así el segmento de activación a su orientación activa. Esta mutación fosfomimética hace que BRAF<sup>V600E</sup> se encuentre en un estado constitutivamente activo (Figura 1.5.) (Davies et al. 2002).



**Figura 1.5.** Representación esquemática de la proteína BRAF, con sus tres regiones conservadas CR1, CR2 y CR3, representados en azul. CR1 y CR2 son dominios regulatorios y CR3 representa el dominio catalítico. La mutación más prevalente que posee el oncogén BRAF se encuentra en la posición 600 (V600E). Imagen adaptada de (C Michaloglou et al. 2008).

En la actualidad hay más de 100 mutaciones somáticas identificadas en BRAF. Estudios posteriores han demostrado que más del 75- 95% de las mutaciones de BRAF clínicamente relevantes se producen en el exón 15, y comprende una mutación puntual



con una sustitución de bases de ADN de timina a adenina (T1799A) que convierte valina a glutamato en la posición 600 de la secuencia aminoacídica (V600E). La actividad catalítica de la proteína mutante BRAF<sup>V600E</sup> se incrementa más de 400-veces en comparación a la proteína “wild type” (BRAF<sup>WT</sup>), y resulta en la activación de la cascada de señalización MEK y ERK (Davies et al. 2002). Con menor frecuencia, otros tipos de mutaciones en BRAF incluyen a V600K (lisina por valina) (1798\_1799delinsAA), y K601E (lisina por ac. glutámico) (A1801G) con un rango de frecuencia del 19 al 28%, además un 8% V600R (valina por arginina), que incrementa la actividad catalítica de BRAF de 100 a 200-veces (Liu et al. 2007)(Menzies and Long 2012)(Rubinstein et al. 2010).

### 1.3.3. Vías de proliferación celular - Vía PI3K

La vía PI3K-AKT es activada por el TKR, que activa a AKT por fosforilación. La vía canónica es PIP3-PI3K-AKT-mTOR, aunque (PI3K, *fosfatidilinositol 3-kinase*) también puede ser activado por RAS-GTP. El gen AKT se encuentra generalmente amplificado en MC, y presenta múltiples funciones efectoras en las proteínas quinasas B y promueven la proliferación y supervivencia celular, además de la capacidad de generar metástasis. Esta vía actúa como segundo mensajero intracelular de múltiples factores de crecimiento o integrinas extracelulares, que se unen a receptores quinasa dependientes. Este proceso es inhibido por PTEN y activado por RAS-GTP. El locus de PTEN, ubicado en el brazo largo del cromosoma 10, es una región cromosómica que frecuentemente se encuentra alterada, principalmente en forma de deleciones homocigotas. Presenta una función supresora tumoral mediante la codificación de una lipoproteína-fosfatasa intracelular que atenúa la activación de la vía del fosfatidilinositol fosfato (PIP3) (Martí R, Sorolla, and Yeramian 2012). Bloquea proteínas anti-apoptóticas BAX, promueve la síntesis de proteínas e induce la degradación mediada por la ubiquitinación en FOXO. La activación de AKT también estimula NFκB, un factor de transcripción pleiotrópico que inhibe la apoptosis y promueve la proliferación celular (Figura 1.3.) (Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio 2013).

### 1.3.4. Vías de estabilidad genómica e inmortalidad RB Y p53

La función de las proteínas retinoblastoma (RB) y p53, vías de supresión tumoral, se desregulan en muchos melanomas esporádicos y familiares. Sin embargo, pérdidas o lesiones de RB y p53 son menos frecuentes en los melanomas esporádicos que en otros tumores sólidos. El gen CDKN2A (quinasa dependiente de ciclina 2a/p16, *cyclin dependent kinase 2a / p16*), implicado en el MC familiar, se localiza en el cromosoma 9p21, y codifica para dos proteínas supresoras de tumor que intervienen en la regulación del ciclo celular. Una de ellas es p16<sup>INK4a</sup> (cuyo peso molecular es 16Kd) y la segunda p14<sup>ARF</sup> (ARF, *alternative reading frame*) (Chin, Garraway, and Fisher 2006). Ambas proteínas son codificadas a partir de la misma región cromosómica, pero son traducidas en patrones de lectura opuestos. La proteína p16<sup>INK4a</sup> se sintetiza mediante la incorporación del exón 1α con los exones 2 y 3 del gen. La proteína p14<sup>ARF</sup> se forma por el empalme alternativo del exón 1β con los exones 2 y 3 (J. Miller 2006). Ambas proteínas inhiben el ciclo celular y regulan la diferenciación, además actúan a través de la vía de la p53 y de la proteína Retinoblastoma (Rb). La proteína p14 regula la apoptosis, al estar mutada, disminuye los niveles de p53 al estimular su destrucción mediante la ubiquitización. Cuando disminuyen los niveles de p53 se reduce la muerte celular programada o apoptosis. Las mutaciones en p14 son poco frecuentes y se asocia a melanoma múltiple y/o a tumores neurales. La proteína p16 pertenece a la vía de regulación molecular INK4A-CDK4/6/ciclina D1 (CCND1)-RB, p16 (*wild type*) inhibe al complejo CDK4, que induce la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). Si la función de p16 está disminuida, Rb se fosforila y libera al factor transcripcional E2F, el cual induce el paso de G1 a S, activando así el ciclo celular. El factor de transcripción E2F se encuentra sobre-expresado en melanomas (Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio 2013)(Zain et al 2015).

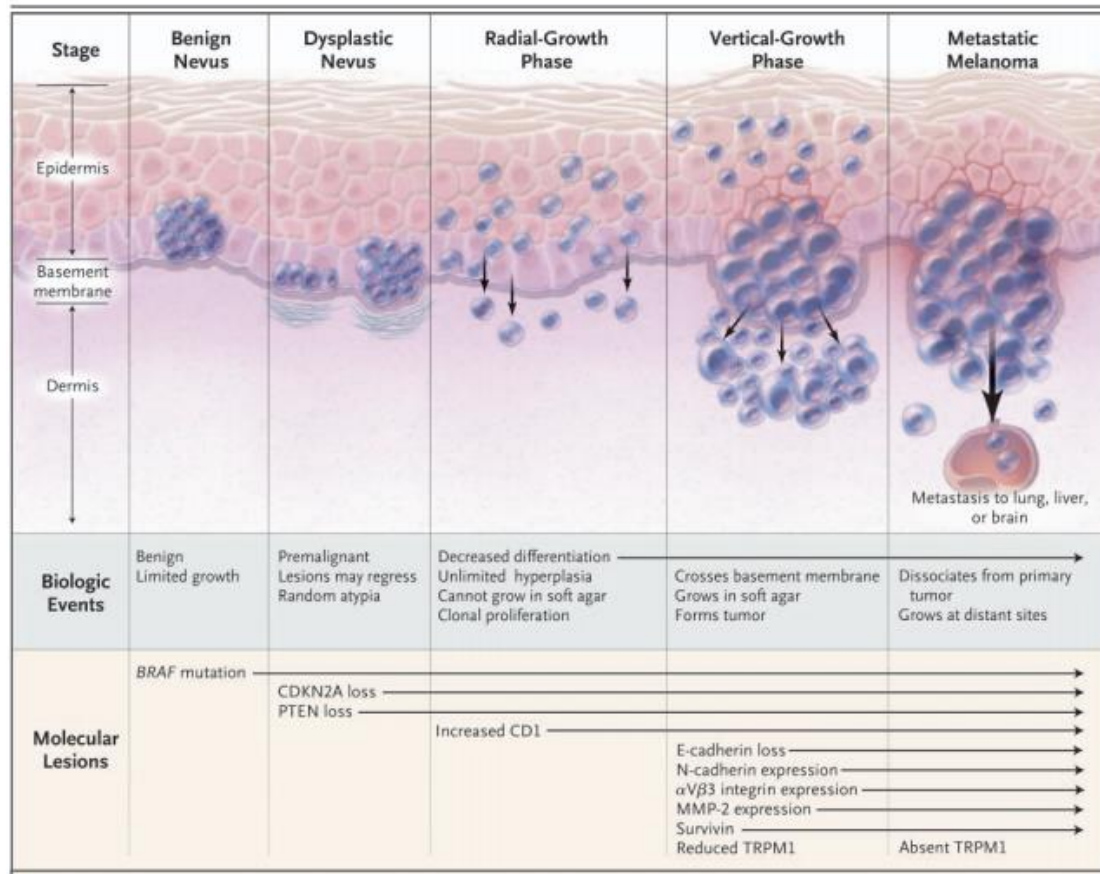
Las lesiones en CDKN2A más comunes en melanoma son mutaciones puntuales que se encuentran en lesiones de línea germinal en 25-40% de los melanomas familiares y en 10% de alteraciones en melanomas esporádicos. Mutaciones puntuales en CDKN2A son siempre asociadas con nevos displásicos. Al igual que con la pérdida de PTEN, la mutación en CDKN2A tienden a coincidir con la mutación BRAF (Chrysiis Michaloglou et al. 2005)(J. Miller 2006)(Zain et al 2015).

## 1.4. ESTADIFICACIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO

### 1.4.1. Clasificación Clínico- Patológica

#### 1.4.1.1. Fase de Progresión tumoral

Clark y colaboradores plantearon un modelo de progresión lineal clínica e histológica para el melanoma cutáneo. Una fase de crecimiento radial o de superficie cuando: **(I)** El melanoma está limitado a la epidermis (*in situ*) benigno o displásico; estas pueden presentar lesiones que tienen potencial de crecimiento pero no la capacidad de atravesar la membrana basal (transición gradual de melanocitos a nevi). **(II)** Se extiende hasta la dermis papilar, proliferación paralela a la dermis (microinvasión); es decir las células tienen capacidad de atravesar la membrana basal e invadir la dermis pero no pueden proliferar ahí. La segunda fase de crecimiento vertical, incluye presencia de mitosis o de nidos de células proliferantes de mayor tamaño que en la epidermis, que producen invasión total de la dermis **(III)**, colonizando inicialmente ganglios linfáticos regionales **(IV)** y desde allí otros órganos **(V)** (Figura 1.1.) (Clark *et al.* 1989). En estadios tempranos el MC es controlado por cirugía, pero una vez que hace metástasis está asociado a una evolución clínica desfavorable del paciente, es decir su pronóstico es pobre (Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio 2013).



**Figura 1.1.** Modelo de progresión clínica del melanoma cutáneo según Clark. **I.** Melanoma *in situ* (nevi) benigno o displásico. **II.** Fase de crecimiento radial. **III.** Fase de crecimiento vertical. **IV.** Metástasis de melanoma. Imagen adaptada de (J. Miller 2006).

### 1.4.1.2. Tipo Histológico

El sistema de estadificación internacional TNM establecido por el Comité Americano Conjunto de Cáncer (AJCC) (Balch et al. 2009)(Mordoh J 2009) se usa habitualmente con el fin de describir la extensión anatómica de la enfermedad en pacientes con MC. Mientras que cada cáncer tiene su propia clasificación dependiendo del órgano de origen, el sistema TNM reúne los siguientes aspectos básicos: tamaño del tumor primario (T), determinando el espesor en milímetros; compromiso de los ganglios linfáticos regionales (N), en número de ganglios metastásicos, sub-clasificándolos en metástasis ganglionar microscópica o macroscópica; y presencia de metástasis a distancia (M). En ganglios regionales la presencia de metástasis se ha sub-clasificado en dependencia del tamaño de la metástasis, menor o igual a 3cm (N1), ó superior (N2). Para metástasis a distancia la sub-clasificación, presenta una categoría (M1), subdividida en dos, según el área afectada (M1a), (M1b) y (M1c) (Balch et al 2010).

Una concentración elevada de deshidrogenasa láctica (LDH) en sangre, se ha mostrado como un poderoso predictor de sobrevida adverso en pacientes con MC. Para establecer el pronóstico, se tiene en cuenta la evaluación clínica e histológica del paciente en conjunto con la edad, sexo y localización anatómica del tumor (Anexo 1) (Balch et al. 2009) (Gershenwald, Soong, and Balch. 2010) (Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio 2013).

La biopsia tumoral inicial es un componente crítico para el diagnóstico. En los MC primarios, el grosor del tumor, el índice mitótico y la ulceración, son características importantes en el pronóstico, con influencia en la evolución clínica del paciente. Una biopsia por escisión de toda la lesión clínicamente aparente, con un margen de piel adyacente de aspecto normal de 1 a 2 cm, es la técnica de biopsia de elección cuando se sospecha MC; las biopsias de raspado deben ser evitadas. Una biopsia incisional puede ser aceptable para el diagnóstico de las lesiones de mayor tamaño (Balch et al. 2009). La medición del espesor tumoral en milímetros o **índice de Breslow**, es un factor pronóstico independiente de otros factores en MC. La AJCC establece 4 categorías en tumores primarios, basados en el índice de Breslow al momento del diagnóstico:  $\leq 1.0\text{mm}$  y  $1.01 - 2.0\text{mm}$  (estadio I);  $2.01 - 4.0\text{mm}$  y  $> 4.0\text{mm}$  (estadio II). Para MC con índice de Breslow  $< 1\text{mm}$ , el pronóstico estimado de sobrevida a los 5 años es mayor al 90%. En contraste, para tumores primarios con índice de Breslow  $> 4\text{mm}$  y con ulceración, el pronóstico estimado de sobrevida a los 5 años es del 45% (Balch et al. 2009)(Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio 2013).

Después de 40 años de ser un componente integral de la estadificación del melanoma, el nivel de invasión de Clark ya no se recomienda como criterio de estadificación, ya que no es un factor pronóstico independiente cuando el índice mitótico está incluido en el análisis. En particular, el **índice mitótico** ha surgido como un poderoso factor pronóstico independiente de sobrevida que ha sido incorporado recientemente a los criterios de estadificación. El estadio III de progresión clínica, que contempla metástasis regionales, observa si las células de melanoma se han extendido a por lo menos un ganglio linfático regional, o se han diseminado desde el sitio primario a tejidos cercanos (metástasis en tránsito) (Balch et al 2010). La séptima edición del sistema de estadificación de la AJCC (2009) aclara que el melanoma metastásico con tumor primario desconocido, es clasificado como estadio III en lugar de estadio IV

(*Gershenwald, Soong, and Balch. 2010*). El estadio IV abarca las metástasis a distancia, donde las células cancerosas se han diseminado a otros órganos lejanos al sitio del tumor primario como piel, pulmones, cerebro, etc (*Balch et al. 2009*)(*Aris, Barrio, and Mordoh 2012*).

Los criterios de estadificación son dinámicos y van evolucionando según se avanza en el conocimiento de la biología tumoral. Sin embargo, el sistema TNM es limitado, ya que la evolución clínica varía considerablemente entre pacientes con el mismo estadio y no contribuye a predecir la respuesta a tratamientos.

### **1.4.1.3. Infiltrado Linfoide**

La progresión tumoral es el resultado de la interacción continua de las células tumorales con su entorno. El sistema inmune desempeña un papel central, ya que puede tanto suprimir como permitir el crecimiento tumoral, pasando de un entorno anti-tumoral a uno tolerogénico, descrito por la “*teoría de la inmuoedición tumoral*” (*Schreiber RD, Old LJ 2011*).

El melanoma cutáneo es un tumor inmunogénico por excelencia, dado que en tumores primarios genera una respuesta inmune del huésped hacia el melanoma, dicha capacidad se pierde en gran medida en los tumores metastásicos, porque puede evadir al sistema inmune diseminándose principalmente por la vía linfática y con gran capacidad de metástasis (*Barrio 2009*).

El análisis de la localización, densidad y funcionalidad de las diferentes poblaciones inmunes en un gran número de muestras de tumores humanos, permite la identificación de componentes beneficiosos y perjudiciales para la evolución del paciente. En una gran diversidad de tumores, se ha establecido que la presencia de linfocitos TH1(pro-inflamatorios) citotóxicos y de memoria está asociada a un mejor pronóstico (*Galon J et al. 2012*). En MC, un perfil inmune asociado a genes de respuesta TH1 y citotoxicidad, junto a la proporción de linfocitos CD8<sup>+</sup>, correlacionan con una respuesta favorable a diferentes vacunas terapéuticas (*Gajewski, J. Louahed, V. G. Brichard 2010*). Por otro lado, la presencia de linfocitos T regulatorios Foxp3<sup>+</sup>

correlaciona con un pronóstico pobre (Gerber AL, Müntz A, Schlapbach C, Shafiqhi M, Kiermeir D, Hüsler R 2014)(Mohos A, Sebestyén T, Liskay G, Plótár V, Horváth S, Gaudi I 2013). Sin embargo, aún queda por conocer más sobre la naturaleza y funcionalidad del infiltrado inmune tumoral, y esclarecer cuáles son los factores de mayor peso en el pronóstico de los diferentes estadios de MC.

De acuerdo con la descripción de Clark y colaboradores, se debe considerar como linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) a los linfocitos que bordean la fase de crecimiento vertical del melanoma o que la infiltran. Se considera que este infiltrado es intenso si cubre o rodea todo el componente invasivo del tumor, o si rodea el margen profundo de la fase vertical (*Brisk*). Se define como no intenso o escaso, si el infiltrado es focal (*non-brisk*). Por último, se define como ausente si no se detecta en la biopsia, o si está presente pero no infiltra al tumor (Clark et al. 1989).

#### 1.4.1.4. Satelitosis Microscópica (Microsatélites)

Day y colaboradores en 1981 definieron a la satelitosis como la existencia de nidos de células de melanoma de un tamaño mayor de 0,05 mm separados claramente de la masa tumoral por una capa de colágeno o grasa subcutánea (no fibrosis o inflamación) del componente invasivo principal del melanoma por una distancia de al menos 0,3 mm (Day et al. 1981). La AJCC incluye la presencia de microsatelitosis en la categoría N2c de la clasificación TNM, lo que implica un estadio III (Balch et al. 2009). La microsatelitosis representa una etapa previa en el desarrollo de las metástasis linfáticas (American Cancer Society 2014), sin embargo, no siempre se detectan.

#### 1.4.1.5. Índice Proliferativo

El **índice proliferativo** o proliferación celular, es un factor predictivo importante de la supervivencia de los pacientes con MC; cuando el número de mitosis / mm<sup>2</sup> aumenta, disminuye la supervivencia de los pacientes con melanoma (Balch et al 2010).

El índice mitótico se determina después de contar las mitosis en los “hot spots” o puntos calientes, con un objetivo de 40X o un aumento de 400X, el recuento es extendido a los campos adyacentes hasta una zona correspondiente a  $1 \text{ mm}^2$  (Balch et al 2010). Si no hay ningún punto caliente o las mitosis son escasas y dispersas al azar en toda la lesión, entonces se elige una zona representativa de la proliferación de ese tumor y comenzando con ese campo, el recuento es extendido a los campos adyacentes hasta una zona correspondiente a  $1 \text{ mm}^2$  (Gershenwald, Soong, and Balch. 2010). Cuando el componente invasivo del melanoma es  $< 1 / \text{mm}^2$ , el número de mitosis en  $1 \text{ mm}^2$  de tejido dérmico que incluye el tumor debe enumerarse como número de mitosis por  $\text{mm}^2$ . En los tumores cuyo componente invasivo comprende un área  $< 1 \text{ mm}^2$ , se recomienda designar la presencia o ausencia de una mitosis como "al menos 1 mitosis/  $\text{mm}^2$ " ("mitogénica") o como  $0 / \text{mm}^2$  ("no mitogénica"), respectivamente (Balch et al. 2009) (Dickson P &, Gershenwald 2011).

En un análisis multivariado realizado por Balch y colaboradores, concluyeron que el índice mitótico fue el segundo factor pronóstico más potente en el análisis de supervivencia, tras el índice de Breslow del tumor primario en pacientes con melanoma localizado y resultó cuarto luego del número de ganglios linfáticos metastásicos, la edad, y la ulceración del tumor primario en pacientes con ganglios regionales micrometástasis (Balch et al 2010).

Una de las técnicas más utilizadas para determinar la proliferación celular, por la sencillez, bajo costo, protocolización y reproducibilidad, es la determinación por inmunohistoquímica de expresión de la proteína Ki-67. Este marcador de proliferación se expresa en todas las fases del ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$  y M), pero no se da en fase  $G_0$  (Ostmeier and Suter 1989). Se encontró una correlación lineal entre el índice mitótico y la expresión de Ki-67 (+), con una equivalencia del 25% de células tumorales Ki-67 (+) por cada mitosis (Ladstein et al. 2010). Los porcentajes elevados de células tumorales Ki-67(+) se asociaron a los melanomas más agresivos. Además, Ki-67 es un indicador pronóstico más fuerte y más robusto que el recuento mitótico (Ladstein et al. 2010).



## 1.4.2. Diagnóstico Molecular

### 1.4.2.1. Técnicas Moleculares

Las técnicas de diagnóstico basadas en pruebas moleculares son una gran alternativa para brindar un diagnóstico adecuado durante el curso de ciertas enfermedades. Los métodos moleculares que se utilizan para determinar las mutaciones de oncogenes tanto en tejido tumoral como en sangre periférica, en ADN y en ácido ribonucleico (ARN). Sin embargo, nos centraremos en los sistemas de identificación de mutaciones que se aplican de forma rutinaria en los laboratorios de anatomía patológica, y que básicamente se pueden clasificar en métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación y métodos basados en PCR en tiempo real (RT-qPCR) (Rodríguez-peralto et al. 2014).

La secuenciación por Sanger es aún la técnica molecular *gold standard* por excelencia para el análisis y detección de mutaciones puntuales. El análisis de mutaciones por secuenciación Sanger se basa en una modificación de la PCR con dideoxynucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar. Proporciona una secuencia completa delimitada por los pares de *primers* de secuenciación y permite la detección de sustituciones puntuales, deleciones e inserciones en el ADN. Permite detectar qué cambio nucleotídico se encuentra en la región de estudio cuando se lo compara con la secuencia consenso, es una técnica de costo accesible. Sin embargo, aunque ha ido mejorando es una técnica con un límite de sensibilidad del 20%, que puede dar lugar a falsos negativos. (Curry et al. 2012).

Uno de los métodos más utilizados en los servicios de anatomía patológica es PCR cuantitativa en tiempo real- transcriptasa reversa (RT-qPCR), donde se realiza la identificación de biomarcadores moleculares en tumores, mediante el lector de fluorescencia. Entre las ventajas del método de RT-qPCR se destaca una alta sensibilidad del 95%, siendo una de sus mayores desventajas el elevado costo (Rodríguez-peralto et al. 2014). Sin embargo, esta metodología está inicialmente diseñada para detectar una sola mutación. Para la detección de mutaciones puntuales es

necesario acoplar a esta técnica el método de secuenciación por Sanger para identificar el cambio nucleotídico.

La prueba diagnóstica cobas® 4800 BRAF/V600 ha sido aprobada por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y tiene el sello de Conformidad Europea (CE). A pesar de ser una prueba inicialmente diseñada para determinar mutaciones en el oncogén BRAF<sup>V600E</sup>, también es capaz de detectar el 70% de las mutaciones en V600K, así como las mutaciones de V600D y V600E2. Entre sus ventajas destacan que es una técnica muy rápida en un sistema automatizado, ya que es posible realizarla en menos de 8 h y obtiene un resultado objetivo mediante la elaboración de informes automáticos, sin la necesidad de interpretar las curvas de amplificación por parte del usuario (*Richter et al. 2013*). Entre sus desventajas se destacan, que al ser una prueba destinada al diagnóstico clínico, no permite la identificación del cambio nucleotídico que se realiza en la secuencia en el oncogén BRAF.

En un estudio realizado en 275 biopsias tumorales de MC, fueron realizados por dos pruebas moleculares diferentes para la detección de mutaciones en BRAF. La prueba de diagnóstico Cobas 4800, detectó 96 de 275 muestras, es decir el 34,9% de mutaciones en el oncogén BRAF<sup>V600</sup>. Sin embargo la secuenciación Sanger, detectó 118 de 275 muestras, un 42,9% mutaciones en BRAF. Por lo tanto, en relación con la secuenciación Sanger, la prueba cobas 4800 exhibió un 80,5% de sensibilidad, de detección del análisis de mutaciones en BRAF<sup>V600</sup> y 99,4% de especificidad (*Qu et al. 2013*).

La tecnología de secuenciación sigue evolucionando y ofrecen un análisis más profundo y complejo de los componentes genéticos de un melanoma. La secuenciación de próxima generación (NGS) o secuenciación masiva en paralelo permite la secuenciación de todo el exón o todo el genoma. Las plataformas moleculares de secuenciación múltiple están disponibles para examinar mutaciones en el oncogén BRAF en el melanoma cutáneo, y el mejor enfoque tecnológico continúa siendo desarrollado, todas estas técnicas son eficientes con buena reproducibilidad para detección. De esta manera se puede obtener un balance positivo entre costo y beneficio de cada una de estas técnicas basadas en métodos moleculares.

## 1.5. TRATAMIENTO DEL MELANOMA CUTÁNEO

### 1.5.1. Tratamiento convencional

La remoción del tumor por cirugía continúa siendo el tratamiento por excelencia del melanoma. Aquellos tumores diagnosticados en forma temprana (estadios I-II) suelen ser curados sólo con cirugía en más del 90% de los casos. Sin embargo, una vez que el melanoma ha invadido la dermis profunda, si se presentan lesiones ulceradas o si aparecen metástasis en ganglios linfáticos, el pronóstico empeora. La supervivencia a 5 años para pacientes con metástasis distantes es menor al 15% (*Balch et al. 2009*). El melanoma suele no responder a terapias convencionales como radioterapia y quimioterapia. El MC no es sensible a la quimioterapia convencional, esto puede deberse o bien a una falta de respuesta primaria a la droga ó al desarrollo de mecanismos de resistencia a drogas adquirida por el tumor (*Mordoh J 2009*). La mayoría de los pacientes con melanoma avanzado reciben terapia sistémica con el agente quimioterapéutico dacarbazina (DTIC), que en la mayoría de los pacientes produce incrementos en la supervivencia o beneficios sintomáticos modestos, con una tasa de respuesta del 7-12% (*Chapman et al. 2011*). Con respecto a la radioterapia, su uso en MC está restringido principalmente a tratamientos paliativos en diseminaciones no operables; como tratamiento alternativo para metástasis locales dermales linfáticas no resecables; y como tratamiento adyuvante post-cirugía (*Mordoh J 2009*). Finalmente están las terapias dirigidas, que comprenden una nueva generación de medicamentos para el tratamiento oncológico, en el que se emplean drogas específicas dirigidas hacia un blanco, ya sean células tumorales o células del sistema inmune (inmunoterapia).

### 1.5.2. Inmunoterapia

El MC es un tumor inmunogénico por excelencia, se han descrito Ag tumorales y numerosas evidencias de inmunoección tumoral, lo que ha llevado al desarrollo de la inmunoterapia (*Aris, M.M.; Mordoh J. 2010*)(*Aris, M. M. Barrio 2012*). Las primeras moléculas inmunomoduladoras aprobadas para el tratamiento oncológico fueron en MC, la interleuquina 2 (IL-2) para enfermedad metastásica (*Tarhini A et al. 2007*), y el Interferón alfa 2b (IFN- $\alpha$ 2b) para su uso como adyuvante post-cirugía, en pacientes con

alto riesgo de recaída, generando un mejor pronóstico en la sobrevida libre de enfermedad, pero no en la sobrevida total de los pacientes (*Kirkwood J. M. et al. 2009*),

Entre las nuevas terapias dirigidas a moléculas inmunomoduladoras, se destacan aquellas contra CTLA-4, interruptor molecular negativo clave en la activación y proliferación de células T. En dos estudios clínicos de fase III se demostró el efecto superior del anticuerpo antagonista de CTLA-4 Ipilimumab, incrementando la sobrevida total a largo plazo, por lo que se aprobó al Ipilimumab para el tratamiento de MC metastásico no operable (*Hodi F. S. et al. 2010*)(*Robert C. et al. 2011*). Otro punto de control inmune, constituido por PD-1/PD-L1, un mediador inmune negativo clave del agotamiento de células T, debido a que su obstrucción produce la activación de las células T y el aumento de sus funciones efectoras, también ha sido el blanco para la inmunoterapia. Estudios clínicos con terapias dirigidas anti-PD-1, como Pembrolizumab, han dado respuestas favorables en pacientes avanzados que recayeron al tratamiento previo con inhibidores de BRAF o CTLA-4, lo que llevó a su aprobación (*Robert et al 2014*). También hay otros anticuerpos monoclonales terapéuticos específicos contra PD-1 y anti-PD-L1 en estudio clínico (*Brahmer et al 2012*)(*Hwu et al 2012*).

Las vacunas terapéuticas incluyen el uso de diferentes tipos de Ag y su objetivo es la "educación" del sistema inmune para el control de posibles focos tumorales existentes, es decir generan una respuesta lenta pero sostenida en el tiempo. Hay diferentes plataformas de vacunas, incluyendo vacunas de péptidos o proteínas; de ácidos nucleicos; de vectores recombinantes; de células tumorales, enteras o lisadas, y de células presentadoras de antígenos (*Aris and Barrio 2015*). Las vacunas peptídicas están dirigidas a uno o varios Ag en MC. Numerosos estudios clínicos mostraron resultados alentadores. Sin embargo, el mayor riesgo de usar vacunas peptídicas es la promoción de resistencias seleccionando poblaciones tumorales Ag negativas (*Aris M et al. 2013*). Entre las estrategias de inmunoterapia, ensayos clínicos previos efectuados en el laboratorio indican que la vacunación con células alogeneicas irradiadas, en etapas tempranas de la enfermedad, puede conducir a prolongar la sobrevida libre de enfermedad de los pacientes (*Barrio M et al. 2006*)(*E. M. von Euw et al. 2008*). La vacuna CSF-470, está constituida por una mezcla de líneas celulares tumorales alogeneicas irradiadas, coadyuvada con BCG y, por el otro, Molgramostim (GM-CSF),

un compuesto químico que tiene la capacidad de atraer hacia el sitio de la vacunación a las células dendríticas. Estas células estimulan la producción de defensas específicas en los ganglios linfáticos (*Aris M et al. 2013*).

En los últimos tiempos, la terapia experimental en MC, es la terapia celular adoptiva (ACT, *adoptive cell therapy*) o transferencia adoptiva de linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL, *tumor infiltrating lymphocytes*), porque los melanomas causan con frecuencia una reacción inmunitaria considerable con muchos linfocitos T que invaden los tumores (*Morgan et al 2006*). Estos son expandidos *ex vivo* a partir de la propia metástasis de un paciente después de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 e IL-2. Los linfocitos T expandidos son entonces re-administrados previo tratamiento con quimioterapia que elimina los linfocitos propios del paciente, favoreciendo la supervivencia de los linfocitos transferidos (*Aris and Barrio 2015*). Así mismo, los linfocitos T pueden ser modificadas genéticamente CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) e infundidos nuevamente en los pacientes. El receptor expresado por los linfocitos T modificados, permite que estos se adhieran a los antígenos en la superficie de las células tumorales, activándolos para que ataquen y destruyan las células tumorales (*Rosenberg et al. 2011*). Actualmente esta terapia experimental ésta siendo estudiada en otros tumores (leucemias) (*Brentjens et al. 2013*).

En resumen, la investigación de la biología e inmunología del MC ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias para su tratamiento, algunas con gran potencial, aunque la conversión de remisiones transientes en curas estables continúa siendo un desafío vital.

### 1.5.3. Terapias dirigidas

Se han desarrollado múltiples fármacos que actúan sobre blancos moleculares. A continuación, se van a describir los principales blancos terapéuticos en MC para los que se están desarrollando fármacos.

### 1.5.3.1. Inhibidores de c-KIT

El interés en el c-KIT como blanco molecular en el tratamiento del MC se ha incrementado por la identificación de un determinado grupo de lesiones melanocíticas que presentan mutaciones activadoras de esta vía. Imatinib (Gleevec, Novartis) es un inhibidor del receptor tirosina-quinasa ATP-competitivo, lo que impide la fosforilación y la posterior activación de los receptores de crecimiento y sus vías de transducción de señales aguas abajo. Imatinib bloquea de forma selectiva la actividad del oncogén BCR-ABL en neoplasias hematológicas, además del receptor del factor de crecimiento plaquetario (PDGFR) y del KIT (*Handolias D et al. 2010*). El dasatinib ha demostrado una eficacia clínica moderada en pacientes con melanoma. La regresión del tumor se observó en aproximadamente el 14% del total de pacientes sin mutaciones c-kit, y en uno de dos pacientes que presentaban un tumor con mutaciones c-kit (*Kluger et al. 2012*). Este nivel de actividad sugiere que la pre-selección de los pacientes basado en biomarcadores, en este caso por la alteración c-KIT, puede identificar un subgrupo de pacientes que potencialmente pueden derivar beneficio de dasatinib (*Aris and Barrio 2015*).

### 1.5.3.2. Inhibidores de BRAF

Dada la prevalencia de la mutación BRAF<sup>V600</sup> en MC (*Davies et al. 2002*), una oleada de pruebas se realizó para el desarrollo de fármacos, diseñados para ser inhibidores selectivos de BRAF y específicamente de la proteína mutada BRAF<sup>V600E</sup> codificada por la mutación más común de este gen.

#### Vemurafenib

El primero de estos agentes a someterse a pruebas clínicas fue vemurafenib (también llamado Zelboraf ®, PLX4032, RG7204, Roche / Genentech, Basilea), molécula pequeña, biodisponible por vía oral que se une selectivamente el sitio de unión a ATP de BRAF<sup>V600E</sup> que inhibe su actividad quinasa (*Chapman et al. 2011*). Vemurafenib fue aprobado para el tratamiento del MC metastásico, en base a los resultados obtenidos en ensayos clínicos de fase III por la FDA en 2011, y por los entes regulatorios de Estados Unidos, Europa y Argentina. La aprobación del vemurafenib, la

respaldó un ensayo multicéntrico internacional (BRIM-3) en el que se sometió a 2.107 pacientes, con melanoma en estadios III C o IV sin tratamiento previo, a exámenes de detección para la mutación V600 en *BRAF* y en el que se identificaron a 675 pacientes. Vemurafenib produjo una mayor tasa de respuesta (48 vs. 5%), y un aumento en la sobrevida total (ST) (84 vs. 64%) y la sobrevida libre de enfermedad (SLE) (5,3 vs. 1,6 meses) con respecto a dacarbazina. Se observaron remisiones tumorales rápidas impresionantes, con un tiempo de respuesta mediana de 1,45 meses (*Chapman et al. 2011*).

### Sorafenib

Sorafenib (Nexavar, Bayer), fue diseñado para inhibir la actividad tirosina quinasa de CRAF, pero pronto se vio que también inhibía a BRAF, tanto a la proteína WT como a la proteína mutada (V600E y otras). Posteriormente, se ha visto que sorafenib es en realidad un inhibidor multiquinasa, capaz de inhibir a otras muchas moléculas como VEGFR2 y -3, PDGFR- $\beta$ , p38 MAPK, FLT3, c-Kit (*Zain et al 2015*). Estos resultados fueron decepcionantes, en el estudio inicial, 37 pacientes no seleccionados con melanoma avanzado recibieron sorafenib, del cual sólo un paciente experimentó una respuesta parcial y el 19% lograron mantenerse estables en la enfermedad temporalmente. Los ensayos posteriores combinaron sorafenib con quimioterapia citotóxica, pero no demostraron ninguna ventaja sobre la quimioterapia sola, y no se observó un efecto genotipo específico para aquellos pacientes con melanoma BRAF<sup>V600</sup> mutado (*Su et al. 2012*) (*Lemeh, Infante, and Arkenau 2012*).

### Dabrafenib

Dabrafenib (Tafinlar ®, GSK2118436, GlaxoSmithKline) es un inhibidor de BRAF selectivo desarrollado después de vemurafenib. Dabrafenib es uno de los dos agentes que fueron aprobados por la FDA en marzo de 2013, para el tratamiento del MC metastásico o no resecables que posean la mutación BRAF<sup>V600E</sup>, inhibe selectivamente la actividad tirosina quinasa de las proteínas RAF, con mayor potencia respecto a BRAF que a CRAF (*Aris and Barrio 2015*). En un ensayo aleatorizado de pacientes con estadio III y IV de MC, dabrafenib extiende la sobrevida libre de progresión. Si bien no se encontró toxicidad limitante de la dosis, se determinó que la dosis recomendada era

de 150 mg dos veces al día (*Mcgettigan S 2014*). De 36 pacientes con metástasis, el 69% experimentó una respuesta parcial o completa (50% confirmada) con una mediana de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de 5,5 meses (*Falchook G et al 2012*)(*Zain et al 2015*).

### 1.5.3.3. Inhibidores de MEK

El trametinib aprobado en el 2013 por la FDA para pacientes con melanoma irresecable o metastásico con mutaciones en BRAF<sup>V600E/K</sup>, es un fármaco clásico, inhibidor selectivo de MEK1 y MEK2, en presentación oral. BRAF activa las proteínas MEK1 y MEK2 en la vía MAPK. Los datos clínicos indican que los inhibidores de MEK pueden impedir el crecimiento e inducir la muerte celular de algunos tumores de melanoma humano con mutaciones en BRAF (*Flaherty. et al. 2012*). La combinación de dabrafenib y trametinib demostró ser superior a la monoterapia y produce menos efectos secundarios, lo que llevó a la aprobación de la FDA y por la EMEA en enero de 2014 (*Aris and Barrio 2015*).

## 1.6. BRAF COMO FACTOR PRONÓSTICO

Actualmente, en el oncogén BRAF se ha identificado una prevalencia del 74 al 90% de mutaciones que resultan de una sola sustitución de valina por el ácido glutámico (V600E) (*Ardekani S et al. 2013*). Se cree que la sustitución de este aminoácido hidrofóbico valina, por un residuo hidrofílico ac. glutámico, expone el sitio activo de la enzima, normalmente incrustado en un bolsillo hidrofóbico (*Wan et al. 2004*). Se ha demostrado que BRAF puede ser un elemento clave en la invasión de células de melanoma y el crecimiento tumoral (*Davies et al. 2002*).

La adquisición continua de estas alteraciones en el oncogén BRAF puede dar lugar a la aparición de subclones del tumor con diferentes ventajas fenotípicas (invasión, proliferación, capacidad de colonizar diferentes órganos, entre otros). Se ha identificado en tumores de MC heterogeneidad intra-tumoral, la presencia de más de un clon de células cancerosas dentro de una masa tumoral dada; y heterogeneidad inter-tumoral, presencia de diferentes alteraciones genéticas en diferentes tumores metastásicos de un solo paciente (*Yancovitz et al. 2012*). Por lo que durante la



progresión tumoral, un tumor que en estadio primario podría ser BRAF<sup>WT</sup>, al realizar metástasis podría adquirir la mutación BRAF<sup>V600E</sup>. Trabajos recientemente publicados han analizado la frecuencia y el impacto de las mutaciones predominantes en el oncogén BRAF y su posible relación con características clínico-patológicas, así como la sobrevida de los pacientes con MC. Estos comprenden un rango de frecuencia de mutación de 17,2 al 72% en el oncogén BRAF<sup>V600</sup>, con una media del 50,4% y una mediana del 60% (Tabla 1.6.1).

**Tabla 1.6.1.** Revisión de bibliografía de diferentes estudios que investigan mutaciones en el exón 15 del oncogén BRAF en MC.

| <b>Autores</b>                 | <b>Año de publicación</b> | <b>Procedencia</b> | <b>Nº pacientes</b> | <b>% BRAF<sup>V600</sup> mutado</b> | <b>Tipo de Tumor</b>        |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Rutkowski <i>et al.</i></b> | 2014                      | Polonia            | 250                 | 62                                  | Mts. ganglio linfático      |
| <b>Picard <i>et al.</i></b>    | 2014                      | Francia            | 72                  | 44,4                                | Mts. ganglio linfático      |
| <b>Meckbach <i>et al.</i></b>  | 2014                      | Alemania           | 437                 | 38,7                                | MC. Primarios               |
| <b>Lee <i>et al.</i></b>       | 2014                      | Corea              | 36                  | 19,4                                | MC. Primarios               |
| <b>Inumarv <i>et al.</i></b>   | 2014                      | Brasil             | 77                  | 70,1                                | MC. Primarios               |
| <b>Barbour <i>et al.</i></b>   | 2014                      | Australia          | 124                 | 46                                  | Mts. ganglio linfático      |
| <b>Tschandi <i>et al.</i></b>  | 2013                      | Viena              | 45                  | 63                                  | Mts. Cutánea                |
| <b>Ekedahl <i>et al.</i></b>   | 2013                      | Suecia             | 237                 | 43                                  | MC. Metastásico             |
| <b>Ardekani <i>et al.</i></b>  | 2013                      | Canadá             | 370                 | 64,6                                | MC. Primarios / Metastásico |
| <b>Qu <i>et al.</i></b>        | 2013                      | Virginia           | 275                 | 42,9                                | Mts. Cutánea                |
| <b>Lee <i>et al.</i></b>       | 2012                      | Corea              | 58                  | 17,2                                | MC. Primarios               |
| <b>Lovly <i>et al.</i></b>     | 2012                      | USA                | 150                 | 60                                  | Mts. Cutánea                |
| <b>Moreau <i>et al.</i></b>    | 2012                      | Francia            | 105                 | 40                                  | Mts. a distancia            |
| <b>Qi <i>et al.</i></b>        | 2011                      | USA                | 107                 | 63,7                                | MC. Nodular                 |
| <b>Cheng <i>et al.</i></b>     | 2011                      | California         | 198                 | 70                                  | Mts. Cutánea                |
| <b>Rubistein <i>et al.</i></b> | 2011                      | USA                | 138                 | 69                                  | Mts. Cutánea                |
| <b>Long <i>et al.</i></b>      | 2011                      | Australia          | 197                 | 48                                  | Mts. Cutánea                |
| <b>Jung <i>et al.</i></b>      | 2010                      | Brasil             | 96                  | 40                                  | MC. Primarios               |
| <b>Lee <i>et al.</i></b>       | 2010                      | Corea              | 2521                | 41                                  | Mts. Cutánea                |
| <b>Venesio <i>et al.</i></b>   | 2008                      | Italia             | 18                  | 72                                  | Mts. cutánea                |
| <b>Liu <i>et al.</i></b>       | 2007                      | Canadá             | 251                 | 45                                  | MC. Primario                |
| <b>Houben <i>et al.</i></b>    | 2004                      | Alemania           | 174                 | 57,5                                | Mts. Cutánea                |

En melanomas primarios, el estado mutacional de BRAF se ha asociado con una edad joven (edad  $\leq 40$  años), subtipo histopatológico (extensión superficial, melanoma nodular) e índice mitótico (Long *et al.* 2011). Para pacientes con tumores primarios el curso clínico de la enfermedad y el estado mutacional en BRAF, no presentaron impacto significativo en la sobrevida libre de progresión (Houben *et al.* 2004). Además, este estudio realizado por Houben y sus colaboradores en 174 pacientes, el 57,5% presentaron mutación en BRAF, asociado a un pronóstico significativamente más pobre, es decir una disminución en la sobrevida del paciente con tumores metastásicos. También se ha demostrado que los pacientes con mutación BRAF<sup>V600</sup> tratados con un inhibidor de BRAF tienen una sobrevida mejor en comparación con aquellos con (BRAF<sup>V600</sup> o BRAF<sup>WT</sup>) que no reciben un inhibidor de BRAF en pacientes con tumores metastásicos (Lemeh, Infante, and Arkenau 2012) (Flaherty 2011).

Estudios realizados por Meckbach y colaboradores en 437 pacientes diagnosticados con MC entre 1989 y 2006, mediante secuenciación de Sanger, detectaron mutaciones en el oncogén BRAF en 38,7% de los pacientes en tumores primarios y mostraron una asociación significativa con la edad, subtipo histológico, así como la tasa mitótica. La tasa de mutación fue del 36,7% en pacientes con evolución libre de enfermedad y el 51,7% en aquellos con metástasis a distancia. No se encontró una relación significativa con la sobrevida de los pacientes, pero un interesante impacto pronóstico significativo en sobrevida libre de progresión fue observado en los pacientes con tumor de grosor de 1 mm o inferior. También se analizaron pacientes con metástasis regionales de MC en ganglio linfático, donde se correlacionó la presencia de BRAF mutado a un peor pronóstico (Meckbach, Bauer, *et al.* 2014). Otro estudio realizado en la Universidad Clermont-Ferrand de Francia con 72 pacientes con MC y ganglio centinela positivo, mostró a BRAF como un indicador de mal pronóstico en pacientes con melanoma en estadio III. Se ha encontrado que BRAF tiene un papel no sólo en la inmortalización celular, sino también en la diseminación metastásica. Estas evidencias sugieren que el *status* mutacional de BRAF podría ser utilizado para mejorar la estadificación de estas poblaciones de pacientes con MC. (Picard *et al.* 2014) (Moreau *et al.* 2012)(Meckben ch, Bauer, *et al.* 2014).

## ***OBJETIVOS***

## Objetivo General

Correlacionar el análisis genético de las mutaciones en el exón 15 del oncogén BRAF con distintas características histopatológicas y la evolución clínica de pacientes con melanoma cutáneo en diferentes estadios.

## Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de mutaciones puntuales en el *exón* 15 del oncogén *BRAF*, por secuenciación de biopsias tumorales de pacientes con melanoma cutáneo con diferentes estadios de progresión y seguimiento clínico.
- Describir las principales características histopatológicas de las biopsias tumorales analizadas.
- Correlacionar el análisis genético obtenido del oncogén BRAF en las biopsias tumorales con los parámetros clínico-patológicos y con la evolución clínica del paciente.

## ***CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS***

## **2.1. MUESTRAS DEL ESTUDIO:**

### **2.1.1. Identificación de las Muestras**

Se analizaron 51 biopsias de tejido tumoral, fijadas en formol y embebidas en parafina de pacientes con MC con diferentes estadios de progresión y con seguimiento clínico a largo plazo, se realizaron de 3 a 4 cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor por cada biopsia. Se verificaron que las biopsias empleadas contengan tejido tumoral por análisis de su histología por microscopía óptica. Este estudio fue elevado para su aprobación por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Alexander Fleming (CEIAF). Se realizó este estudio en aquellas muestras cuyos pacientes dieron su consentimiento informado, protegiendo sus datos personales.

### **2.1.2. Análisis Histopatológico**

Se realizaron cortes en blanco de cada biopsia de melanoma cutáneo analizada en vidrios con carga positiva. Los mismos fueron teñidos por el servicio de anatomía patológica con hematoxilina-eosina, estos fueron observados por microscopía óptica para determinación de las principales características histopatológicas. Se determinó el índice proliferativo de los tumores por expresión del marcador Ki-67, detectado por inmunohistoquímica y posterior análisis por microscopía.

- La caracterización clínico - patológica de las biopsias tumorales del estudio fue determinadas de la siguiente manera (Tabla 2.1.2.1.):

**Tabla 2.1.2.1.** Análisis clínico- patológico de biopsias tumorales de MC

| – Tumores primarios:                            |  |
|---|--|
| <i>Índice de Breslow</i>                        | Se midió el espesor del tumor, categorizándolo en un límite inferior o superior a 2 mm   |
| <i>Ulceración</i>                               | El criterio aplicado para definir la presencia o ausencia de ulceración, fue determinar si la epidermis se encuentra intacta sobre la biopsia analizada.   |
| <i>Índice proliferativo</i>                     | Se determinó por el porcentaje de células tumorales Ki-67 (+) en 1mm <sup>2</sup> de tejido tumoral con mayor proliferación (punto caliente, ver pág. 20).<br>$\text{I.P. (\%)} = \frac{\text{células tumorales Ki-67 (+)}}{\text{células tumorales Ki-67(+)} + \text{células tumorales Ki-67 (-)}} * 100$ |
| <i>Melanina</i>                                 | Proporción de células de MC con melanina en toda el área del tumoral (%)   |
| <i>Infiltrado linfoide</i>                      | Se determinó la presencia y distribución del infiltrado linfoide asociado a tumor, ya sea escaso (NB, non-brisk) o abundante (B, brisk).   |
| – Tumores en metástasis en ganglios linfáticos: |  |
| <i>Metástasis ganglionar</i>                    | Determinado por la presencia o ausencia de tumores en ganglios linfáticos.   |
| <i>Índice proliferativo</i>                     | Se determinó por el porcentaje de células tumorales Ki-67 (+) en 1mm <sup>2</sup> de tejido tumoral con mayor proliferación (punto caliente, ver pág. 20).<br>$\text{I.P. (\%)} = \frac{\text{células tumorales Ki-67 (+)}}{\text{células tumorales Ki-67(+)} + \text{células tumorales Ki-67 (-)}} * 100$ |
| <i>Número de ganglios</i>                       | Fue determinado en la población de tumores que presentaron metástasis ganglionar, categorizándolos por el número de ganglios mayor o menor a 3.  |
| <i>Melanina</i>                                 | Proporción de células de MC con melanina en toda el área del tumoral (%)   |
| <i>Infiltrado linfoide</i>                      | Se determinó la presencia y distribución del infiltrado linfoide asociado a tumor, ya sea escaso (NB, non-brisk) o abundante (B, brisk).   |
| – Otros tumores metastásicos :                  |  |
| <i>Otras Metástasis</i>                         | Determinado por la presencia o ausencia de metástasis en tránsito o metástasis a distancia.  |

## 2.2. PROCEDIMIENTOS

### 2.2.1. Microdissección Láser

De las 51 biopsias tumorales analizadas, 4 biopsias fueron procesadas a través del procedimiento de microdissección láser previo al aislamiento de ADN, debido a la elevada cantidad de linfocitos que se encontraban presentes en el tumor.

*Preparación de cortes en micrótopo y coloración para Microdissección:* Se irradiaron con luz UV por 30min los vidrios o soportes donde se colocaron los cortes, se realizó 1 corte de 10µm de espesor.

*Desparafinización:* Se incubó por 15min en estufa a 50°C con (1000ul) de xileno y se fijó el corte.

*Tinción con violeta de cresilo:* se prepararon diferentes concentraciones de etanol (100%, 95%, 75%, 50%), para la rehidratación del tejido, el vidrio con la sección tumoral se rehidrató por pasaje por las diferentes concentraciones de etanol por 1 min 2 veces en cada uno. Después se procedió a teñir con violeta de cresilo 10% v/v, durante 1 min. Para la deshidratación se procedió a pasar los vidrios por las diferentes concentraciones de etanol, yendo de menor a mayor. Por último se dejó secar a temperatura ambiente.

*Microdissección Láser:* se realizaron los cortes por medio del microscopio de microdissección láser Leica a través del programa *Leica Laser Microdissection* por el cual por medio del láser se realiza el corte en el área detectada y seleccionada previamente en el microscopio. Es necesario obtener al menos un área promedio de  $1.10^6 \mu\text{m}^2$  de tejido para realizar extracción de ácido nucleico eficaz.



## 2.2.2. Aislamiento de ADN

### 2.2.2.1. Aislamiento de ADN de biopsias de tejido tumoral de melanoma cutáneo fijadas en formol y embebidas en parafina

Para la extracción del ADN se utilizó el Kit de aislamiento, *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Life-Technologies).

*Rehidratación del tejido:* Se adicionó 1ml de xileno, homogenizado por *vortex* e incubado por 15min a 50°C, se centrifugó por 2 min a 15000g. El sobrenadante fue retirado sin tocar el pellet y se repitió el procedimiento de rehidratación. Después se colocó 1ml de etanol 100%, homogenizó (*vortex*) y centrifugó por 2 min a 15000g a T° ambiente, se colocó 1ml de etanol 80%, mezcló (*vortex*) y centrifugó por 2 min a 15000g a T° ambiente. Se retiró el sobrenadante y se secó el pellet durante 15min.

*Digestión del tejido con proteinasa K:* Se preparó el buffer de digestión en un tubo Eppendorf aparte por muestra: 100 ul de buffer de solución de digestión (kit) con 4 ul de proteinasa K. Mezclado suavemente. Se colocó 104ul del buffer de digestión a cada muestra y fue incubado a 50°C por 18 horas.

*Aislamiento del ADN:* Se preparó el buffer de aislamiento aditivo/etanol por muestra en otro tubo Eppendorf: 120ul de buffer aditivo aislamiento (kit) con 275ul de etanol al 100%. Se colocó 375ul del buffer de aislamiento a cada muestra, se mezcla y esta se torna de consistencia lechosa. Después se pasó la mezcla a través de la columna con filtro, previamente rotulado cada tubo. Se centrifugó a 15000g por 1min. Se desechó el flujo y se colocó otro eppendorf.

*Lavado:* 700ul de wash 1 (kit) a cada muestra fueron añadidos. Se centrifugó a 15000g por 1min, se desechó el flujo y se adicionó 500ul de wash 2/3 (kit) a cada muestra. Se centrifugó a 15000g por 1min, se desechó el líquido.

*Digestión del tejido con RNasa:* Se preparó el buffer de digestión RNasa para cada muestra en otro eppendorf: 50 ul de agua destilada estéril apirógena (Roux) con

10ul de RNasa (kit). Después se añadió 60ul del tampón de digestión RNasa a cada muestra y se incubó por 30min a T° ambiente.

*Lavado:* Se adicionó 700ul de wash 1 (kit) a cada muestra, centrifugados a 15000g por 1min, se desechó el flujo y añadió 500ul de wash 2/3 (kit) a cada muestra. Se centrifugó a 15000g por 1min y se repitió 2 veces este proceso. Luego se retiró la columna que contiene el filtro y se colocó en un nuevo eppendorf de 1,5ml previamente rotulado.

*Elución:* La elución se realizó en 40ul de agua destilada estéril apirógena (Roux). Se centrifugó a 15000g por 1 min y se repitió este paso. Se realizó el eluido final en un volumen de 80ul de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Se almacenó a -20°C.

*Rendimiento y pureza:* Se midieron las concentraciones de cada muestra por espectrofotometría (Nanodrop), mediante la absorción de luz UV de longitud de onda de 260 nm; y análisis de la pureza Abs<sub>260/280</sub> con un ratio mayor a 1.8-2. El espectrofotómetro Nanodrop permitió medir volúmenes de 1 a 2 ul. El coeficiente de conversión para el ácido nucleico de ADN fue igual a 50 en la absorbancia 260nm.

#### **2.2.2.2. Aislamiento de ADN de líneas celulares**

En el presente trabajo se emplearon líneas celulares de melanoma cutáneo humano establecidas en nuestro laboratorio, cultivadas según buenas prácticas de laboratorio, como control de las diferentes variantes mutacionales de BRAF<sup>V600</sup>.

Línea celular #3: BRAF<sup>V600E</sup> heterocigota

Línea celular #4: BRAF<sup>V600E</sup> homocigota

Línea celular #8: BRAF<sup>WT</sup>

Línea celular #10: BRAF<sup>V600K</sup> homocigota

Para la extracción de las líneas celulares se utilizó el reactivo DNAzol ® (Invitrogen), el procedimiento se realizó bajo las instrucciones del fabricante.

Para la lisis celular se adicionó 1 *ml* de DNAzol ® y se homogenizó con movimientos circulares, con la ayuda de una micropipeta se tomó todo el lisado de las células y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 *ml*, a continuación se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se colocó el sobrenadante en un tubo estéril nuevo eppendorf de 1.5 *ml*.

Para precipitar el ADN se colocó 0.5 *ml* de etanol 100% y se mezcló por inversión varias veces, nuevamente se centrifugó a 4000 rpm por 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. El ADN se lavó dos veces con etanol al 75% (v/v) y se centrifugó a 1000 rpm por 2 minutos y nuevamente se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el tubo por 30 segundos a temperatura ambiente dejando el tubo invertido. El ADN se resuspendió en 0.2 *ml* de H<sub>2</sub>O.

Se midió la concentración de cada muestra por espectrofotometría (Nanodrop).

### **2.2.3. Determinación de mutaciones en el exón 15 del oncogén BRAF**

#### **2.2.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (NESTED – PCR)**

La amplificación del exón 15 del oncogén BRAF se realizó por medio de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (NESTED-PCR), técnica previamente estandarizada en nuestro laboratorio, que se basa en dos reacciones de PCR seguidas, con dos juegos de primers diferentes cada una (Tabla 2.2.3.1.2.). En la reacción NESTED-PCR, el producto de la primera amplificación es el molde ideal para la segunda reacción, que amplifican un fragmento contenido en el primer amplicón, aumentando así la sensibilidad del método. Esto se realizó con el termociclador de 96 pocillos con bloque “*VeriFlex*” de Applied Biosystems (Tabla 2.2.3.1.1).

**Tabla 2.2.3.1.1.** Cóctel para NESTED-PCR

| 1 <sup>er</sup> PCR     |          |             |              | 2 <sup>da</sup> PCR     |         |             |              |
|-------------------------|----------|-------------|--------------|-------------------------|---------|-------------|--------------|
| Reactivo                | [Stock]  | [Final]     | Vol.[1rx]    | Reactivo                | [Stock] | [Final]     | Vol.[1rx]    |
| <b>Buffer</b>           | [5X]     | [1X]        | 10 µl        | <b>Buffer</b>           | [5X]    | [1X]        | 10 µl        |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | [25µM]   | [2 µM]      | 4 µl         | <b>MgCl<sub>2</sub></b> | [25µM]  | [2 µM]      | 4 µl         |
| <b>dNTPs</b>            | [25 µM]  | [0,5 µM]    | 1 µl         | <b>dNTPs</b>            | [25µM]  | [0,5 µM]    | 1 µl         |
| <b>PFwL</b>             | [10 µM]  | [0,5 µM]    | 2,5 µl       | <b>PFwS</b>             | [10µM]  | [0,5 µM]    | 2,5 µl       |
| <b>PRevL</b>            | [10 µM]  | [0,5 µM]    | 2,5 µl       | <b>PRevS</b>            | [10µM]  | [0,5 µM]    | 2,5 µl       |
| <b>Taq Pol.</b>         | [5U/ µl] | [0.025U/µl] | 0,25 µl      | <b>Taq Pol.</b>         | [5U/µl] | [0.025U/µl] | 0,25 µl      |
| <b>H<sub>2</sub>Od</b>  | -        | -           | 26,67 µl     | <b>H<sub>2</sub>Od</b>  | -       | -           | 28,75 µl     |
| <b>ADN</b>              | -        | [100ng]     | 5 µl         | <b>Amp. 1ra rx*</b>     | -       | -           | 1 µl         |
| <b>Total</b>            | -        | -           | <b>50 µl</b> | <b>Total</b>            |         |             | <b>50 µl</b> |

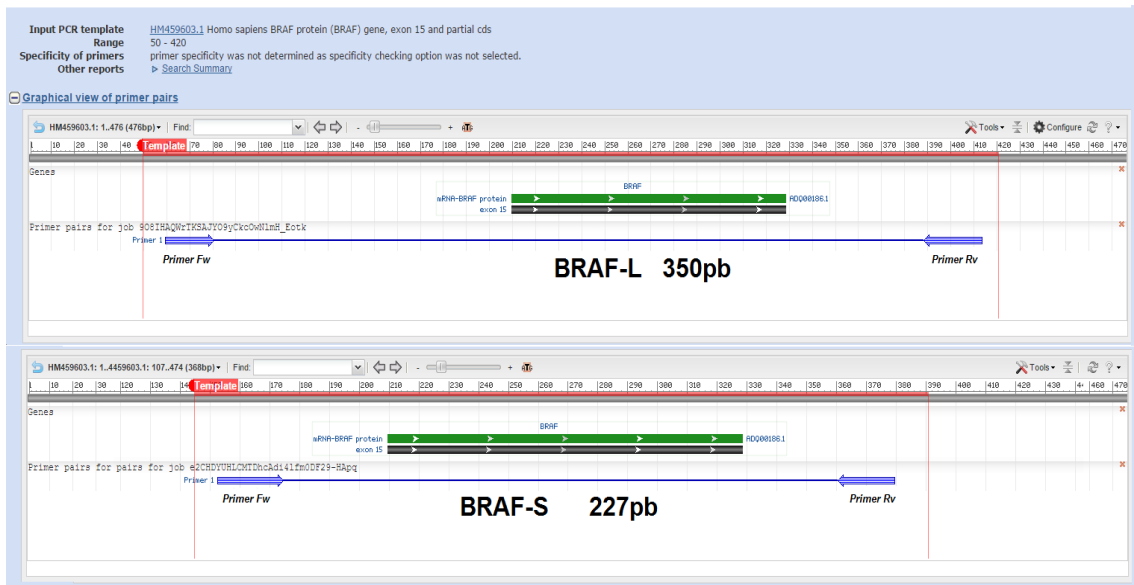
\*Amp. 1ra rx = Amplificación del primer amplicón de la primera reacción de la PCR (354pb).

**Tabla 2.2.3.1.2.** Nombres, secuencias, temperatura de *melting* y posición de los *primers* empleados para la amplificación del exón 15 del oncogén BRAF (*Homo sapiens BRAF protein (BRAF) gene, exón 15 and partial cds*).

| <i>Primer</i>    | Secuencia<br>5' - 3'      | Posición<br>5' - 3' | T <sub>m</sub> °C |
|------------------|---------------------------|---------------------|-------------------|
| <b>BRAF-L-Fw</b> | TTGACTCTAAGAGGAAAGATG     | 60 a 80             | 52.33             |
| <b>BRAF-L-Rv</b> | TTGAGACCTTCAATGACTTTCTAGT | 413 a 389           | 57.93             |
| <b>BRAF-S-Fw</b> | TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG    | 153 a 179           | 56.76             |
| <b>BRAF-S-Rv</b> | GCATCTCAGGGCCAAAAT        | 379 a 361           | 56.13             |

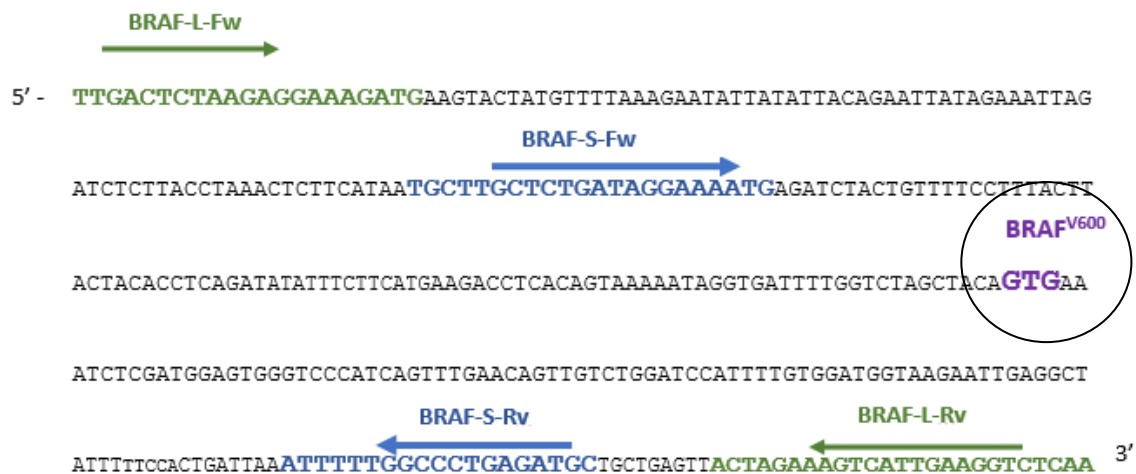
Los dos pares de *primers* utilizados fueron obtenidos y alineados mediante el programa de base de datos BLAST correspondientes a la secuencia del gen *Homo sapiens BRAF protein (BRAF) gene, exón 15 and partial cds*, con la codificación:

HM4596031, en la posición 60–413, con un amplicón de 354pb y 227pb respectivamente (Figura 2.2.3.1.1).



**Figura 2.2.3.1.1.** Alineación de *primers* BRAF-L y BRAF-S utilizados para la detección del exón 15 del oncogén BRAF por el programa BLAST. Imagen adaptada de (BLAST 2015).

Para la identificación molecular de la mutación puntual, utilizamos el programa BLAST, programa que nos ayudó a identificar la posición exacta BRAF<sup>V600</sup> dentro de la secuencia de 227pb diseñada previamente en el laboratorio (Figura 2.2.3.1.2.).



**Figura 2.2.3.1.2.** Alineación de *Primers*, BRAF-L y BRAF-S, en la secuencia de referencia del exón 15 del oncogén BRAF, Homo sapiens BRAF protein (BRAF) gene. Detección del “*hot spot*” dentro del amplicón de 227pb.

El programa utilizado para la amplificación del exón 15 del oncogén BRAF por NESED-PCR fue realizado bajo las condiciones descritas previamente en el Centro de Investigaciones Oncológicas-Fundación Cáncer (CIO-FUCA) (Tabla 2.2.3.1.3) (Chervo F. 2014).

**Tabla 2.2.3.1.3.** Programa para la amplificación del exón 15 oncogén BRAF, mediante la técnica molecular NESTED-PCR.

| Análisis                 | Ciclos | Temperatura       |      | Tiempo  |
|--------------------------|--------|-------------------|------|---------|
| <i>Desnaturalización</i> | 1      | 95°C              |      | 3 min.  |
| <i>Ciclado</i>           | 40     | Desnaturalización | 95°C | 30 seg. |
|                          |        | Anillado          | 60°C | 30 seg. |
|                          |        | Extensión         | 72°C | 30 seg. |
| <i>Extensión final</i>   | 1      | 77°C              |      | 5 min.  |

Los resultados de la amplificación del exón 15 del oncogén BRAF, fueron observados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, observada mediante espectrofotometría de luz azul (435-490nm).

### 2.2.3.2. Purificación del producto de PCR

Una vez realizadas las PCRs, el producto fue purificado por precipitación con una solución de polietilenglicol (PEG) al 20%. Para la purificación, en un tubo eppendorf 1,5 ml se agregó el volumen del producto de PCR y un volumen igual de la solución PEG. Luego de homogeneizar por pipeteo, se incubó en baño térmico a 37°C por 15 min y se centrifugó a temperatura ambiente (TA) por 15 min a 15.000 g. Posteriormente se realizó un lavado del precipitado de ADN con 125 µl de etanol 80% y se dejó reposar por 1 min. Se centrifugó a TA por 8 min a 15.000 g, se descartó el sobrenadante y con el fin de evaporar el alcohol, el pellet de ADN fue centrifugado con el tubo abierto por unos 20-30 min a 15°C y 15.000 g. Finalmente el ADN fue suspendido en 25 µl de agua Roux y posteriormente se procedió a medir las concentraciones de cada muestra, por espectrofotometría (Nanodrop).

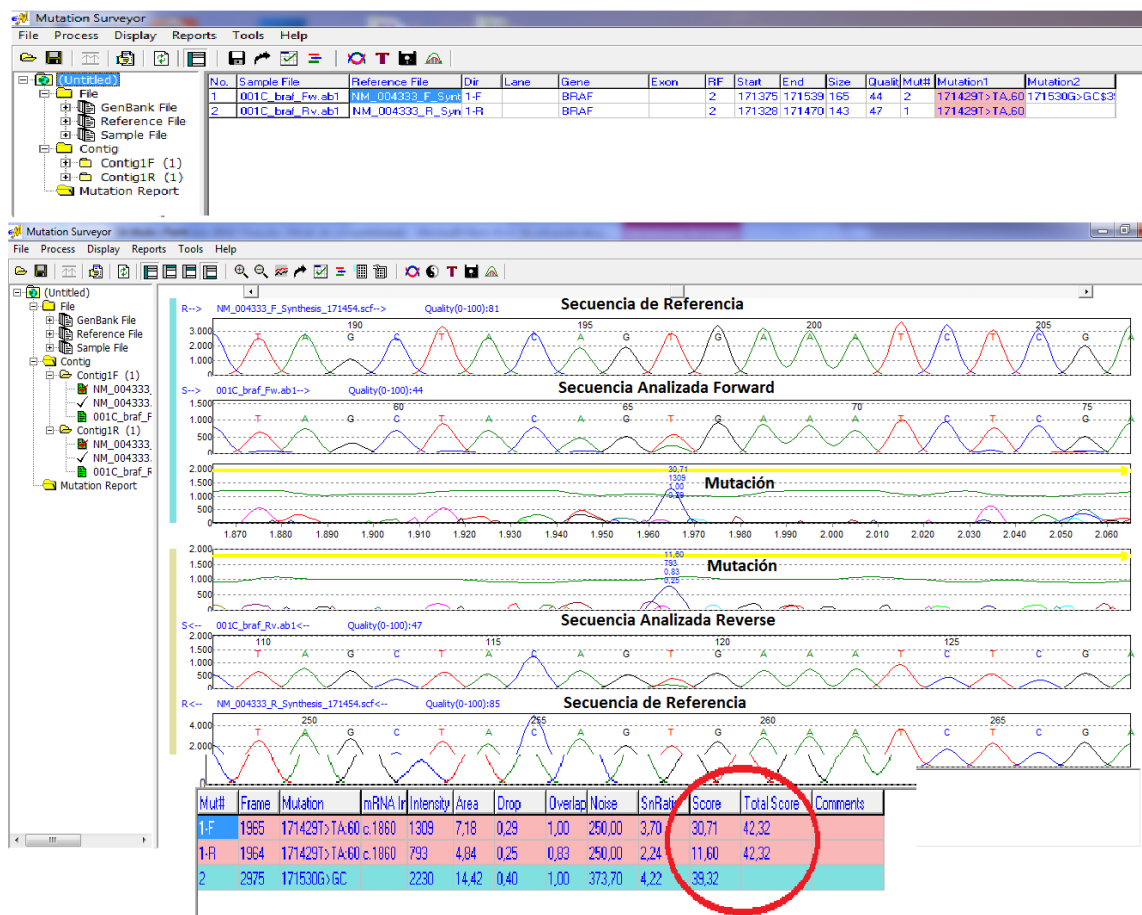
### 2.2.4. Análisis de Secuencias

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados por el método de Sanger a través del secuenciador capilar Applied Biosystems 3730xl de la empresa MacroGen Corea. Posteriormente los resultados fueron confirmados por el servicio de secuenciación MacroGen USA, por el mismo método. Se realizó una doble lectura de los productos, por lo tanto se obtuvieron cromatogramas de la secuencia *forward* (Fw) y de la secuencia *reverse* (Rv) para cada muestra. Éstos fueron analizados mediante los programas Chromas versión 1.62 y *Mutation Surveyor* versión 3.97.

Para el análisis de secuencias por *Mutation Surveyor* se despliegan varios ítems:

**Sample file:** es una lista de las secuencias Fw y Rv de la muestra obtenidas por secuenciación del exón de interés, las cuales han sido cargadas en el programa. **Reference file:** secuencia WT de GenBank con la cual las secuencias de la muestra fueron alineadas. **Dir (Direction):** el número indica el número de *contig* y las letras F/R, la dirección de las secuencias (Fw y Rv). Los *contigs* son grupos de secuencias alineadas que se forman con los archivos cargados. Hay un *contig* para la secuencia Fw y otro para la secuencia Rv de la muestra. **Gene:** nombre del gen, como está en el archivo de GenBank de referencia. **Exón:** número de exón como está en el archivo de referencia. **RF (Reading frame):** marco de lectura del exón. **Start/End:** primera y última base que delimitan la zona de comparación entre las secuencias. **Size:** tamaño en pares de bases de la región de comparación. **Quality:** es una medida de la proporción S/N en la secuencia de la muestra anterior a su alineamiento con la referencia. Luego de que la muestra es alineada con la referencia, este valor por lo general aumenta. Los valores abarcan un rango de 0 a 100, donde 100 representa la mayor calidad. **Proporción S/N (Signal/Noise):** *Signal* se define como la intensidad del pico de la mutación y *Noise*, como la intensidad del ruido en el pico de mutación. Esta proporción indica cuán grande debe ser la señal con respecto al ruido para que una mutación sea registrada. **Mut #:** número de mutaciones encontradas en la cadena Fw y Rv de la muestra. **Mutation:** reporte de las mutaciones halladas. Según la nomenclatura de sustituciones, primero se indica el número de base o posición de la mutación en el archivo de GenBank; luego se reporta la mutación como: base de referencia (*GenBank file*) > base mutada (*sample file*). Si la mutación cae dentro

de la región codificante en el archivo de GenBank, se especifica el número de codón, el aminoácido WT y el aminoácido que resulta de la mutación. Por último se especifica el *Mutation Score*, que indica el nivel de confianza con el que se determina la mutación. **Color de la letra:** el color azul indica que la mutación ha sido determinada con un alto nivel de confianza; cuando es de color rojo, la mutación ha sido determinada con un menor nivel de confianza. **Color del fondo:** cuando es rosa quiere decir que la variación en la secuencia de nucleótidos resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos, con el fin de evaluar el estatus mutacional del exón analizado (Figura 2.3.).



**Figura. 2.3.** Análisis de los cromatogramas tanto Fw y Rv de una muestra de ADN de biopsia tumoral, del cual se amplifica el exón 15 del oncogén BRAF, por medio del programa Mutation Surveyor.



## 2.2.4. Análisis Estadístico

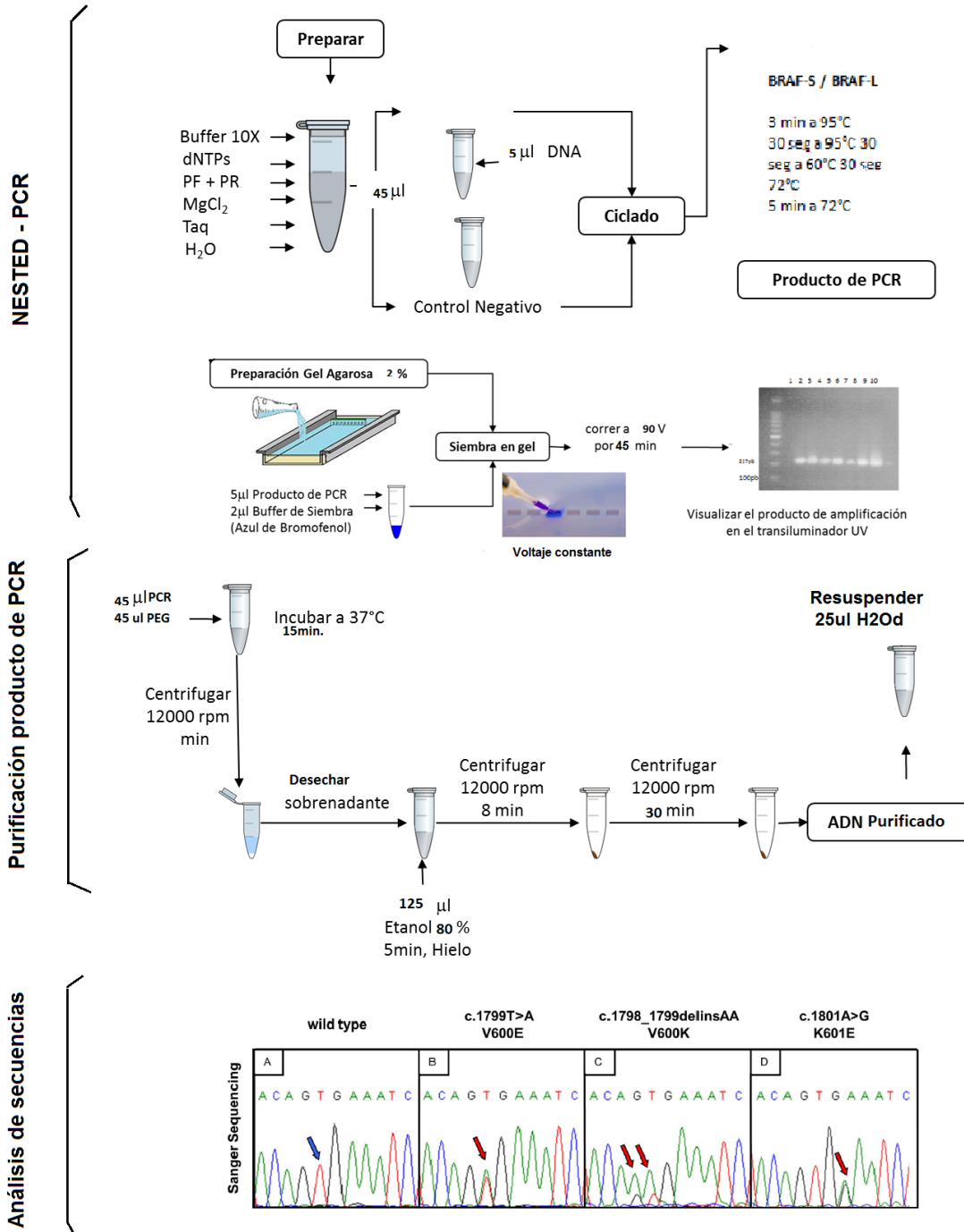
Una vez terminada la fase experimental, se analizó la correlación de la mutación en el exón 15 del oncogén BRAF<sup>V600</sup> con las características clínico patológicas de los pacientes con MC. Para la detección se realizó una matriz con 1 para las muestras positivas, las cuales poseen la mutación en BRAF<sup>V600</sup> y con 0 para las muestras BRAF<sup>WT</sup>, las que no presentan mutación en la región de estudio.

Se realizó el análisis descriptivo de frecuencias con los datos de la variable dependiente y con la información disponible de los pacientes (edad y sexo), además de la frecuencia del *status* mutacional del oncogén BRAF<sup>V600</sup> y la prevalencia de la mutación BRAF<sup>V600E</sup>.

El análisis para la distribución estadística de sobrevida y sobrevida libre de enfermedad se llevó a cabo usando el método de Kaplan-Meier, para el contraste univariado se utilizó la "Prueba *Log-rank (Mantel-Cox)*" y "Prueba *Gehan-Breslow-Wilcoxon*". Se definió como sobrevida al tiempo en meses desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha del fallecimiento y como sobrevida libre de enfermedad (SLE) al periodo de tiempo desde la fecha de entrada en remisión completa hasta la recaída, fallecimiento o última consulta (lo que primero tuviese lugar). La mediana de sobrevida corresponde al tiempo en que la mitad de la población aún no ha sufrido el evento en estudio.

Para finalizar el análisis estadístico de este estudio, mediante el software *Graph Pad Prism* versión 5, el cual permite obtener pruebas de bondad de ajuste, se realizó la hipótesis nula que especifica un modelo distribucional teórico para los datos, que en este estudio es que las variables categóricas son independientes, por lo cual se emplearon las pruebas "Prueba exacta de *Fisher's*" y "Prueba de  $\chi^2$ "; es decir que la mutación de BRAF<sup>V600</sup> no posee una relación con las características clínico-patológicas de pacientes con MC. Para las variables cuantitativas del estudio, fueron utilizados los test estadísticos "Prueba de *Mann-Whitney*", "Prueba de *Unpaired t*", los cuales funcionan mediante la clasificación de todos los valores de menor a mayor, y comparando el rango promedio en los dos grupos tanto del *status* mutacional de BRAF, como de cada característica clínico-patológicas de los pacientes con MC. Se consideró significancia estadística en aquellas pruebas con un  $p < 0,05$ .

➤ **Esquema de determinación de mutaciones en el exón 15 del oncogén BRAF**



## ***CAPÍTULO 3: RESULTADOS***

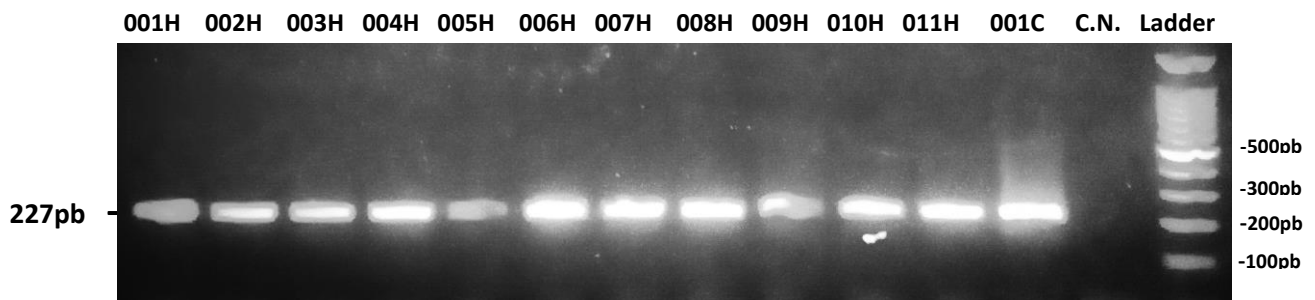
## 3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA

### 3.1.1. Aislamiento del tejido tumoral

Uno de los principales inconvenientes en la extracción del tejido tumoral en la biopsia FFPE, es que el método tradicional de almacenar las biopsias involucra su fijación en una solución de formol, con posterior deshidratación e inclusión en parafina. Sin embargo, la desparafinización posterior afecta profundamente la calidad del ácido nucleico de la muestra. Por esta razón se modificó el protocolo inicial de aislamiento de ácido nucleico, realizando una incubación por 30 min a 50°C en xilol, divididos en 2 tiempos, previo a la extracción y realizando una rehidratación más paulatina por pasaje por las diferentes concentraciones de etanol (100%, 95%, 75%, 50%), por 1 min 2 veces, con el fin de aumentar la eficiencia de la extracción del ácido nucleico. Con estas modificaciones en el protocolo se obtuvo una mayor eficiencia de extracción, tanto en la cantidad como en la calidad de ADN obtenido. En la optimización de este método, a partir de 2 cortes de 4  $\mu\text{m}$  de biopsia tumoral FFPE, se obtuvo un rendimiento de ADN total promedio de 4575  $\text{ng}/\text{mm}^2$  por tejido tumoral, con una relación Abs260/280 de 1.8, mientras que con el protocolo sin modificar a partir de 2 cortes de 4  $\mu\text{m}$  de biopsia tumoral FFPE, se obtuvo un rendimiento de ADN total promedio de 2112  $\text{ng}/\text{mm}^2$ . De las 51 biopsias tumorales procesadas, se aisló ácido nucleico en forma exitosa en un 100% de los casos.

### 3.1.2. NESTED –PCR

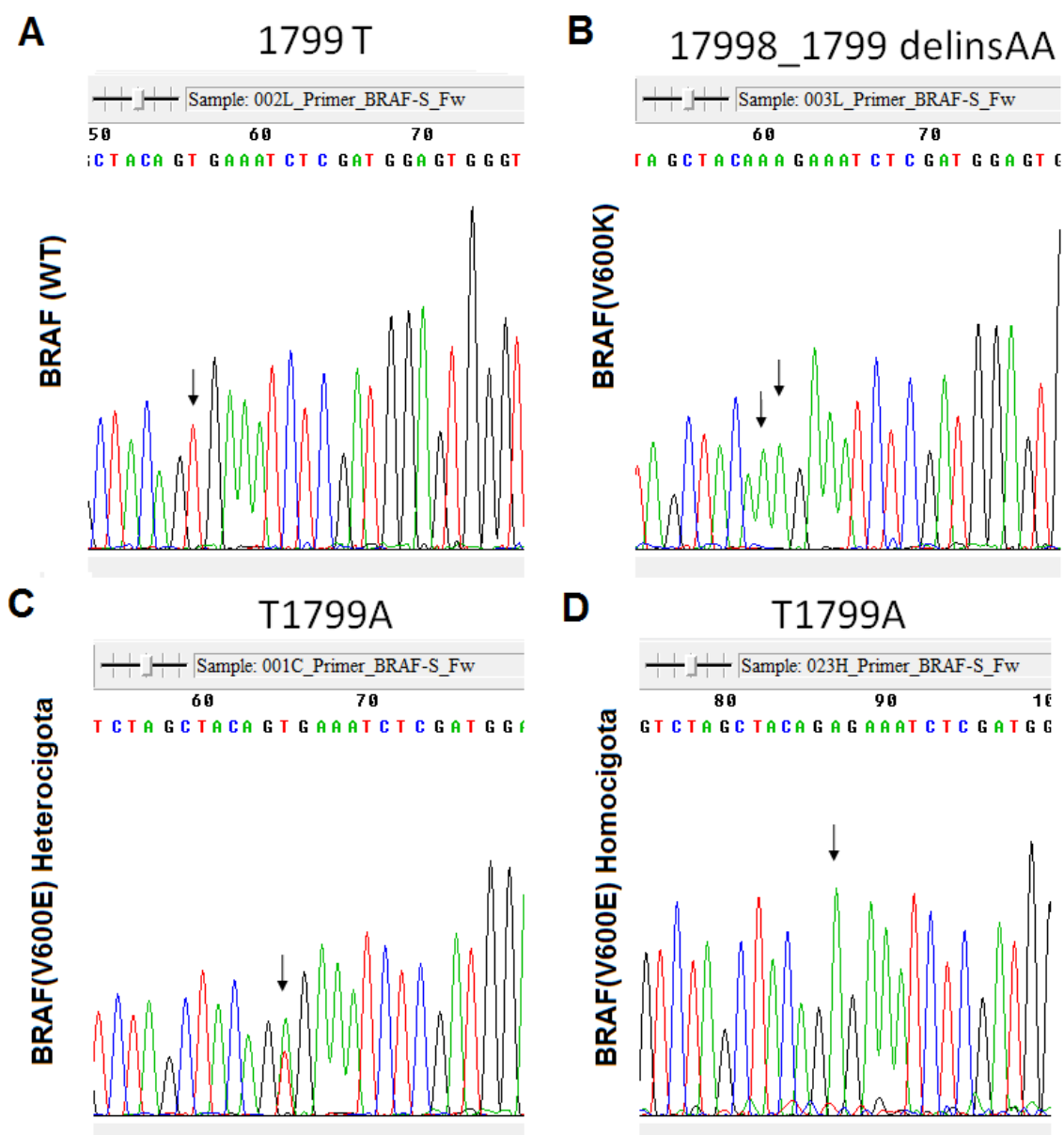
La amplificación del fragmento de 227pb del exón 15 del oncogén BRAF, con el ADN de las 51 biopsias tumorales analizadas mediante NESTED-PCR, mostró el tamaño esperado en la amplificación de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio (Figura 3.1.1.).



**Figura 3.1.1.** Revelado de un amplicón de 227pb con gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio de 11 pacientes con MC analizados en el presente estudio. Utilizando controles: 001C muestra positiva BRAF<sup>V600E</sup>. C.N. muestra negativa (H<sub>2</sub>O).

### 3.1.3. Análisis de secuenciación

La secuenciación realizada por el servicio de Macrogen envió cromatogramas con alta resolución. Cuando se realizó la purificación del amplicón, fue procesado en mayor tiempo a temperatura ambiente para el paso de secado del amplicón antes de la elución final, permitiendo que el etanol no produzca interferencias en la lectura (Figura 3.1.2.).



**Figura 3.1.2.** Ejemplos representativos de cromatogramas analizados en el presente estudio, que indica las diferentes mutaciones que se producen en el oncogén BRAF en pacientes con MC, que pueden ser heterocigotas como homocigotas.

### 3.1.4. Comparación del método de determinación de mutaciones empleado

De 44 pacientes ingresados en este estudio, 8 pacientes se habían realizado el estudio de mutación BRAF<sup>V600</sup> por medio de la prueba de diagnóstico molecular cobas® 4800 BRAF/V600. Estos resultados fueron confirmados en el presente estudio, mediante secuenciación Sanger, con una correlación del 100% (Tabla 3.1.1).

**Tabla 3.1.1.** Determinación de mutación BRAF<sup>V600</sup> mediante cobas® 4800 BRAF/V600 y por secuenciación de Sanger.

| Muestras | Cobas® 4800 | Secuenciación Sanger |
|----------|-------------|----------------------|
| 017H     | BRAF(V600E) | BRAF(V600E)          |
| 007H     | BRAF(V600E) | BRAF(V600E)          |
| 004H     | BRAF(V600E) | BRAF(V600E)          |
| 024H     | BRAF(WT)    | BRAF(WT)             |
| 020H     | BRAF(V600E) | BRAF(V600E)          |
| 027H     | BRAF(V600E) | BRAF(V600E)          |
| 014H     | BRAF(WT)    | BRAF(WT)             |
| 037H     | BRAF(V600E) | BRAF(V600E)          |

La determinación del *status* mutacional del oncogén BRAF fue realizada en las 51 biopsias tumorales por secuenciación de Sanger, en el servicio de Macrogen Korea y confirmadas por Macrogen USA, con una concordancia del 100% en los cromatogramas analizados.

## **3.2. ESTUDIO DE CORRELACIONES DEL ESTADO MUTACIONAL DEL EXÓN 15 DEL ONCOGÉN BRAF CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO – PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES Y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES**

### **3.2.1. Características de los pacientes y su evolución clínica**

Este estudio reunió un total de 51 biopsias tumorales de MC pertenecientes a 44 pacientes, en estadios: II 9,1% (4/44), III 75% (33/44) y IV 15,9% (7/44).

En cuanto a la distribución según el sexo 52,3% (23/44) son pacientes de sexo masculino y 47,7% (21/44) pacientes de sexo femenino. La edad comprendía un rango de 15 a 64 años, con un promedio de edad de 46 años.

De las 51 biopsias analizadas, 25 eran tumores primarios y 26 tumores metastásicos (Tabla 3.2.1.). Entre los tumores primarios, 10 eran tumores nodulares y 15 tumores de extensión superficial. Entre las localizaciones de los tumores metastásicos, 15 eran metástasis ganglionares, 4 metástasis de cerebro y 7 metástasis cutáneas, de los cuales, 83,3% (20/24) tumores metastásicos se encontraban en estadio III y 16,7% (4/24) en estadio IV.

La sobrevida de los pacientes con MC tuvo un seguimiento hasta el 01 de abril del 2015 de 4 a 146 meses, con seguimiento medio de 73 meses.

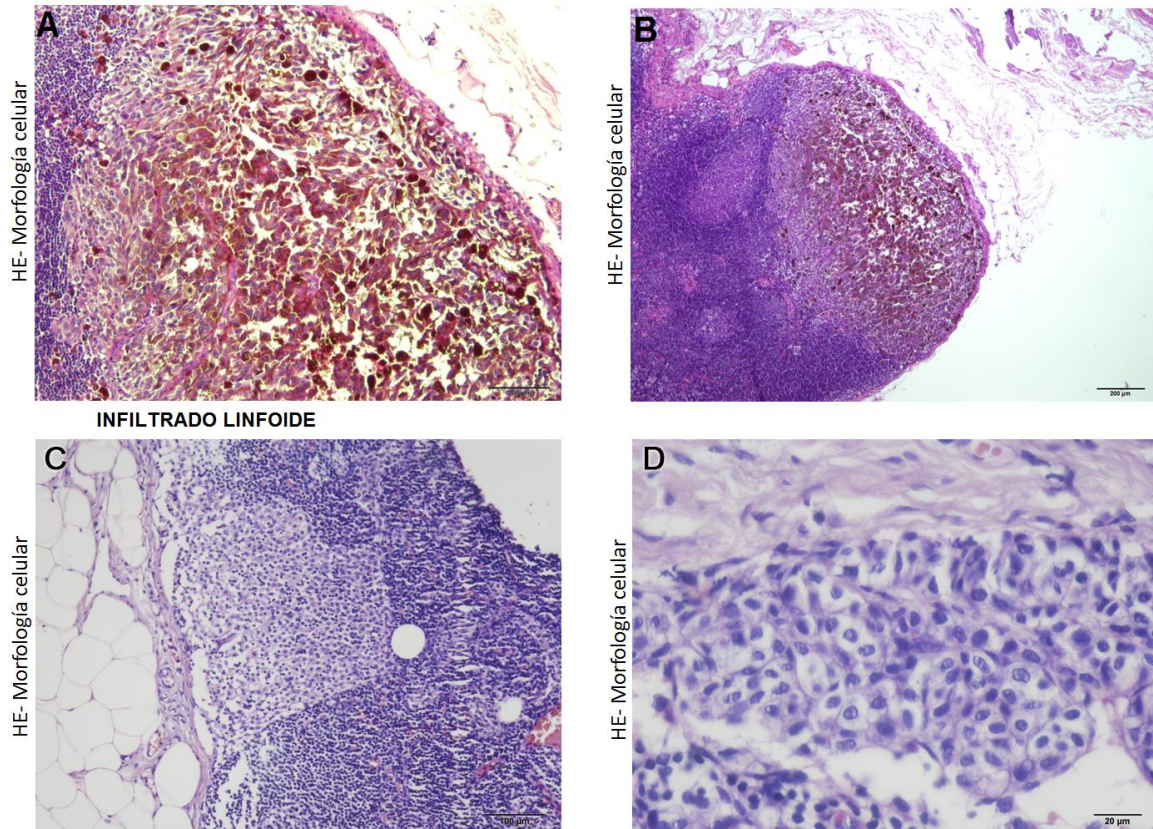


| <b>Tabla 3.2.1. Características clínicas de los pacientes con MC incluidos en el estudio basado en el status mutacional del oncogén BRAF</b> |          |                               |                          |   |
|--|----------|-------------------------------|--------------------------|---|
| <b>BRAF Status</b>   | <b>N</b> | <b>BRAF<sup>V600mut</sup></b> | <b>BRAF<sup>WT</sup></b> | <b>Valor p</b>  |
| Población de estudio   | 44       | 34                            | 10                       |   |
| <b>SEXO</b>  |          |                               |                          |   |
| Femenino   | 21       | 16                            | 5                        | <i>"Prueba X<sup>2</sup>" (p=0,8700)</i>  |
| Masculino  | 23       | 18                            | 5                        |   |
| <b>EDAD</b>  |          |                               |                          |   |
| > 50 años  | 17       | 12                            | 5                        | <i>"Prueba X<sup>2</sup>" (p=0,4397);<br/>"Prueba Unpaired t" (p=0,2233)</i>                |
| <50 años   | 26       | 21                            | 5                        |   |
| <b>ESTADIO CLÍNICO (AJCC)</b>  |          |                               |                          |   |
| II   | 4        | 3                             | 1                        | <i>"Prueba X<sup>2</sup>" (p=0,3651)</i>  |
| III  | 33       | 27                            | 6                        |   |
| IV   | 7        | 4                             | 3                        |   |
| <b>SOBREVIDA LIBRE DE ENFERMEDAD (01/04/2015)</b>  |          |                               |                          |   |
| Población de estudio   | 43       | 17/21                         | 4/21                     | <i>"Prueba Log-rank (Mantel-Cox)" (p=0,2432) "Prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon" (p=0,5874)</i> |
| <b>SOBREVIDA TOTAL (01/04/2015)</b>  |          |                               |                          |   |
| Población de estudio   | 43       | 23/30                         | 7/30                     | <i>"Prueba Log-rank (Mantel-Cox)" (p=0,7491) "Prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon" (p=0,4415)</i> |

### 3.2.1.1. Características Clínico-Patológicas de biopsias tumorales de MC

Las características clínico-patológicas de las 51 biopsias tumorales fueron evaluadas por los métodos descritos previamente, para su correlación con el *status* mutacional del oncogén BRAF<sup>V600</sup>.

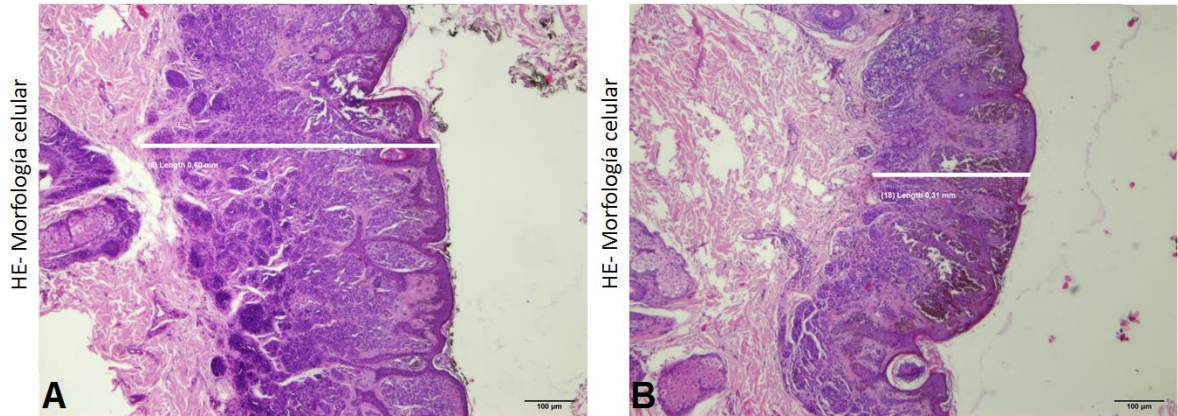
- ❖ Entre estas características, el infiltrado linfoide y la expresión de melanina fueron analizadas como características generales tanto para tumores primarios como tumores metastásicos (Figura 3.2.1.1).

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO - PATOLÓGICAS BIOPSIAS TUMORALES MC****PIGMENTACIÓN-MELANINA**

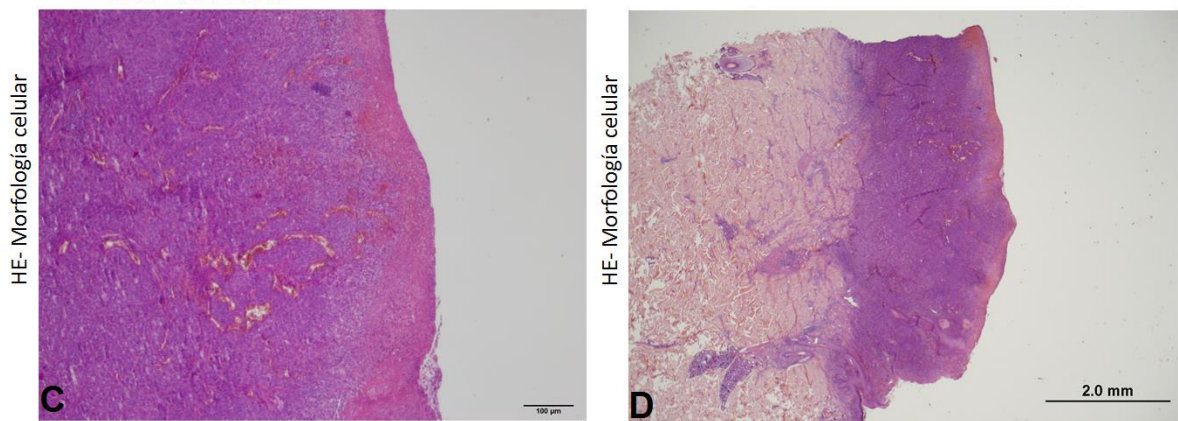
**Figura 3.2.1.1** Ejemplos representativos de morfología de la biopsia tumoral de MC por tinción con HE. En **(A)** y **(B)** se muestra un tumor de MC con expresión de melanina. En **(C)** y **(D)** una metástasis de MC en ganglio linfático rodeada por infiltrado linfoide. Escalas: **A-C** 100 µm; **D** 20 µm.

- ❖ En los tumores primarios (25 biopsias), fueron analizadas las principales características clínico-patológicas que representan a este tipo de muestras, como son el índice de Breslow, ulceración y el índice proliferativo (Figura 3.2.1.2).

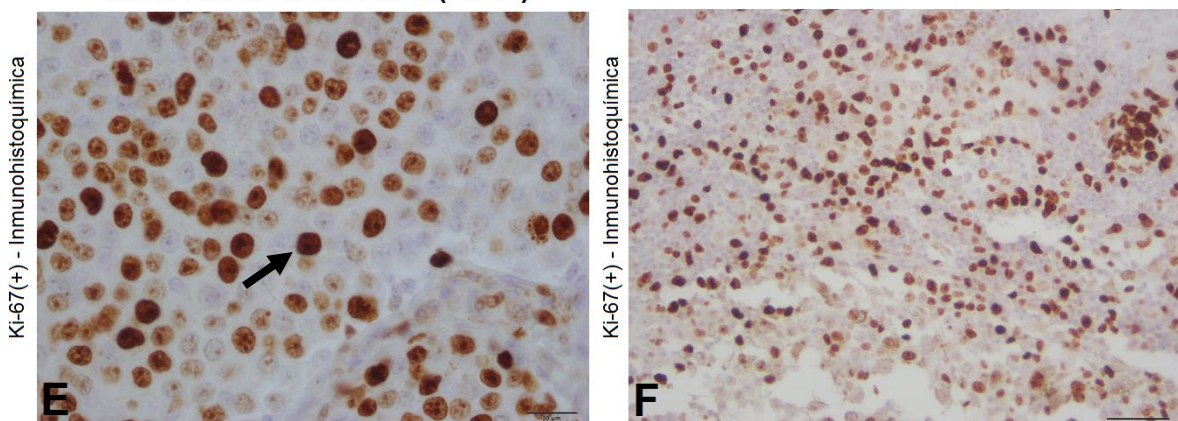
### TUMORES PRIMARIOS ÍNDICE DE BRESLOW



### ULCERACIÓN



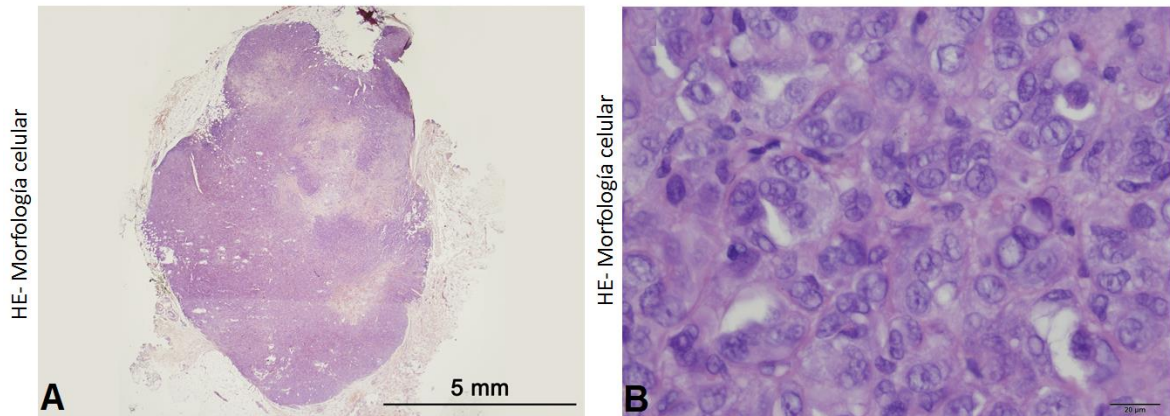
### ÍNDICE PROLIFERATIVO (Ki-67)



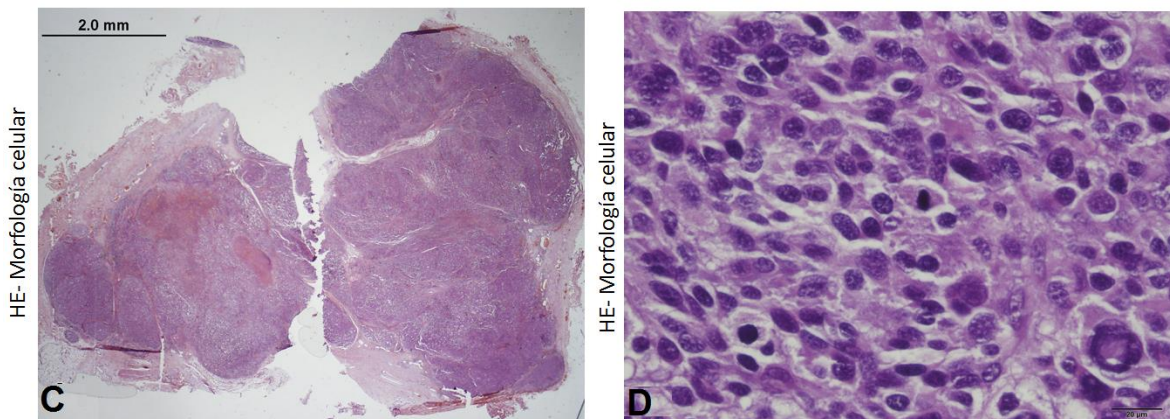
**Figura 3.2.1.2** (A) y (B) Ejemplos representativos de un tumor primario de MC por tinción con HE, indicando el índice de Breslow. En (C) y (D) se muestran un tumor primario con presencia de ulceración, observado a diferentes aumentos, (E) y (F) Ejemplo representativo del índice proliferativo en una biopsia tumoral de MC, inmunohistoquímica Ki-67 (+). La flecha indica una célula tumoral Ki-67 (+). Escalas: A-C 100µm; B 2 mm; E 20 µm; F 50µm.

- ❖ Para los tumores metastásicos, 26 biopsias tumorales fueron evaluadas en donde las principales características clínico-patológicas que representan a este grupo son la presencia de metástasis en ganglio linfático, número de ganglios linfáticos comprometidos y el índice proliferativo (Figura 3.2.1.3.)

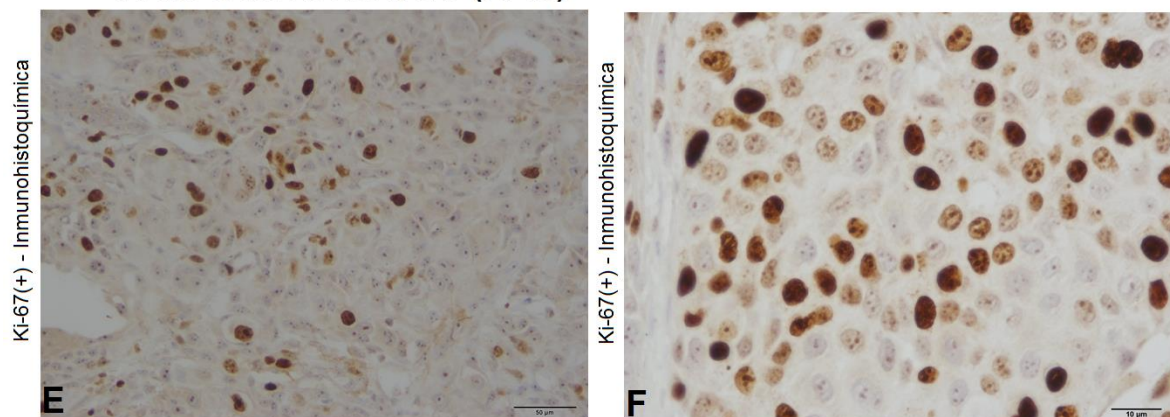
### TUMORES METASTÁSICOS METÁSTASIS CUTÁNEA



### NÚMERO DE GANGLIOS LINFÁTICOS COMPROMETIDOS



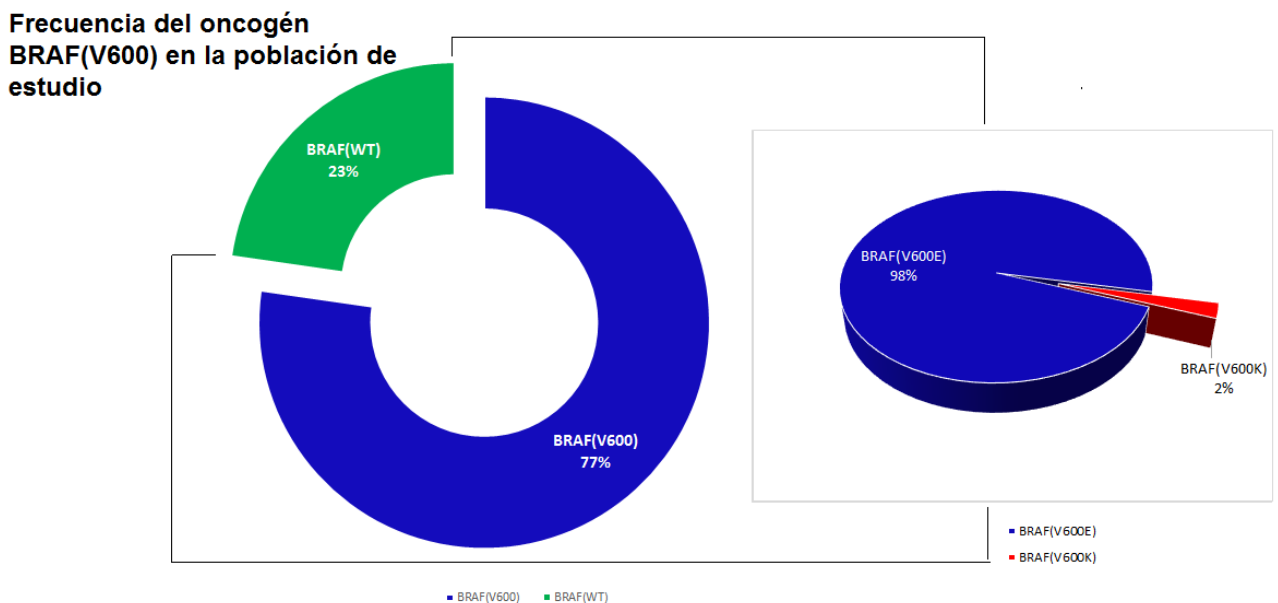
### ÍNDICE PROLIFERATIVO (Ki-67)



**Figura 3.2.1.3** Ejemplos representativos de morfología de la biopsia tumoral de MC por tinción con HE. En (A) y (B) se muestra un tumor con una metástasis cutánea de MC. En (C) y (D) metástasis extensas de MC en ganglios linfáticos. Y en (E) y (F), un ejemplo representativo del índice proliferativo en la metástasis, células tumorales Ki-67(+) por inmunohistoquímica. Escalas: A 2mm; B,D,F 20 µm; C 2mm; E 50µm.

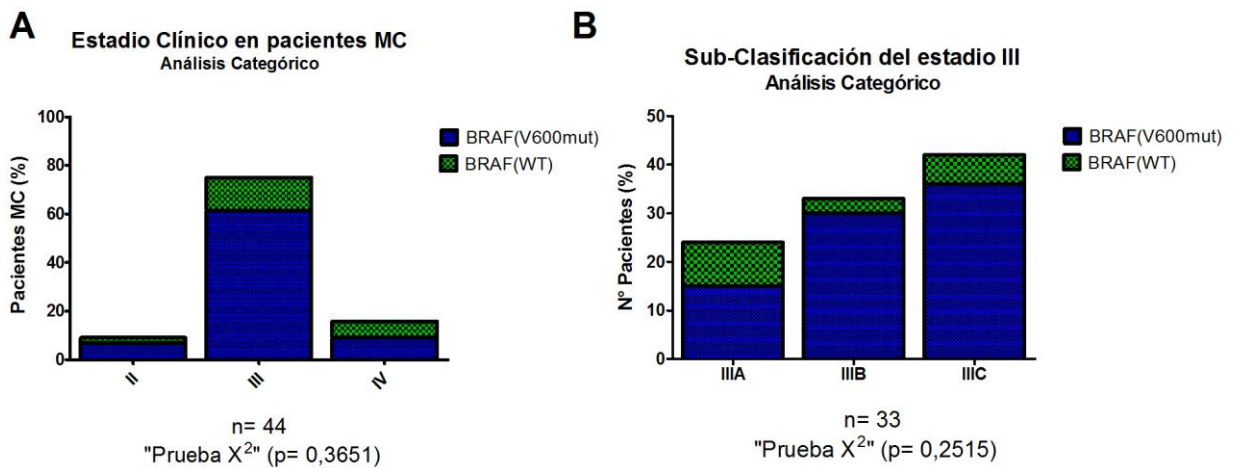
### 3.2.2. Frecuencia del *status* mutacional del oncogén BRAF<sup>V600</sup> en la población de estudio

El *status* mutacional del oncogén BRAF<sup>V600</sup> en los 44 pacientes de MC, presentó una prevalencia del 77% (34/44). El 23% (10/44) no presentaron mutación en el exón 15 del oncogén BRAF, es decir fueron BRAF<sup>WT</sup>. De los tumores BRAF<sup>V600</sup> mutado, se observó una prevalencia en la mutación BRAF<sup>V600E</sup> (98%) (40/41), seguida de BRAF<sup>V600K</sup> (2%) (1/41) (Figura 3.2.1.). Además el porcentaje de mutación BRAF<sup>V600</sup> para el sexo masculino fue de 78% (18/23) y en el sexo femenino el 76% (16/21) para mutación BRAF<sup>V600</sup>, siendo una distribución similar del oncogén BRAF<sup>V600</sup> en ambos sexos.



**Figura. 3.2.1.** Frecuencia de mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> en la población de pacientes con MC analizadas en este estudio (%). En detalle se muestra la distribución de las mutaciones en BRAF<sup>V600</sup> (%).

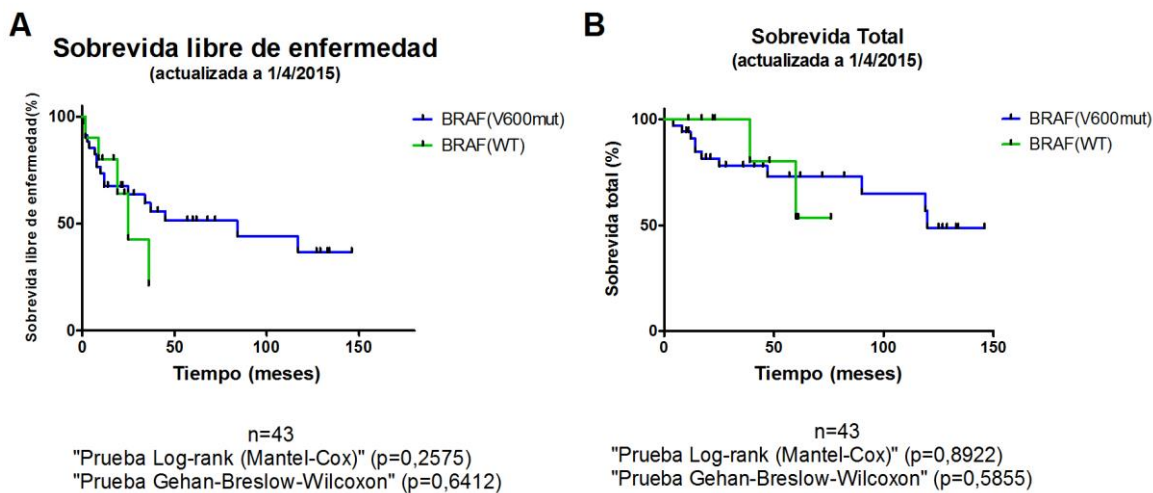
Los pacientes con MC fueron categorizados dado su estadio clínico de progresión. De los 44 pacientes, el 9% (4/44) se encontraban en estadio II, donde el 75% (3/4), presentaron la mutación BRAF<sup>V600</sup>. La mayor parte de la población en el presente estudio 75% (33/44), se encontraba en estadio III, de los cuales el 82% (27/33) tienen la mutación BRAF<sup>V600</sup>. Los pacientes en estadio IV correspondieron a un 16% (7/44) en la población de estudio, donde el 57% (4/7) tenían prevalencia en BRAF<sup>V600</sup> (Figura 3.2.2).



**Figura 3.2.2.** A. Distribución de BRAF<sup>V600E/K</sup> según los estadios clínicos de los pacientes con MC del estudio (%), B. Distribución de BRAF<sup>V600E/K</sup> en los subtipos de MC estadio III (%). Prueba estadística X<sup>2</sup>. Se indica el n de la población del estudio.

Durante el análisis de sobrevida libre de enfermedad por el método de Kaplan-Meier, con un seguimiento máximo de 146 meses, el 49% (21/43) no progresaron en la enfermedad, y en éstos pacientes la prevalencia en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado fue del 77%. Por otro lado, el 51% (22/43) progresaron, con un 80% de prevalencia en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado. En el análisis de sobrevida total, se observó que de 43 pacientes, el 70% (30/43) continúan con vida, con una prevalencia en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado del 76%, mientras que el 30% (13/43) de los pacientes fallecieron, con prevalencia en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado del 85%. No se encontró una

asociación estadísticamente significativa entre el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado y la sobrevida libre de enfermedad, así como con la sobrevida total en los pacientes analizados (Figura 3.2.3.).



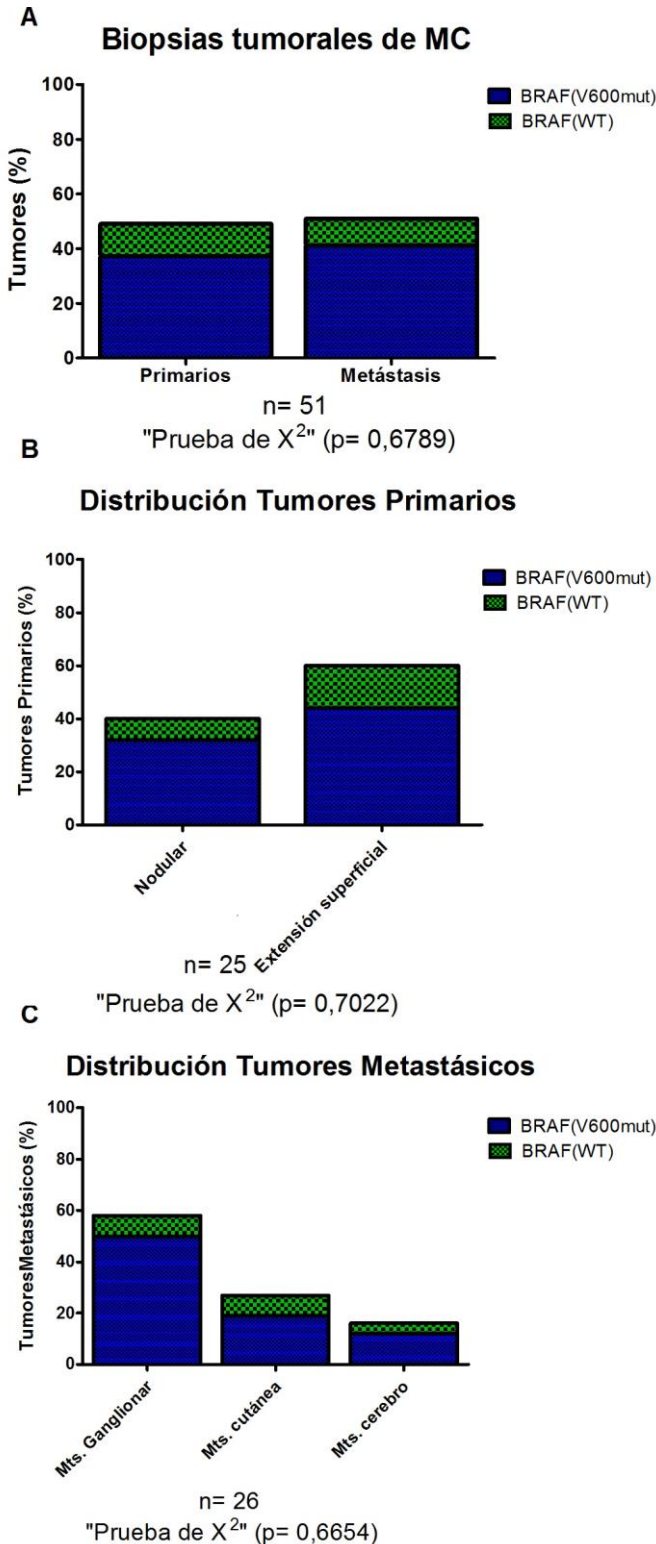
**Figura 3.2.3.** A. Sobrevida total de pacientes con MC agrupados según status mutacional de BRAF<sup>V600</sup>. B. Sobrevida libre de enfermedad de pacientes con MC agrupados según el status mutacional del oncogén BRAF<sup>V600</sup>. "Prueba Log-rank (Mantel-Cox)" y "Prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon". Se indica el n de la población. Seguimiento clínico máximo de 146 meses.

### 3.2.3. Análisis de correlaciones entre la mutación en el exón 15 del oncogén BRAF con las características clínico-patológicas de las biopsias tumorales

Las biopsias totales analizadas presentaron una prevalencia del oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado de un 78,4% (40/51) con respecto a BRAF<sup>WT</sup> 21,6% (11/51). De estas biopsias el 49% (25/51) eran tumores primarios, donde el 76% (19/25) presentaron la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup>, estos fueron clasificados en tumores primarios nodulares y de extensión superficial. Los tumores primarios nodulares tenían una prevalencia del 80% (8/10) para BRAF<sup>V600</sup> mutado, y en los tumores de extensión superficial el 73,3% (11/15) presentaban dicha mutación.

Para el análisis biopsias tumorales metastásicas, el 80,8% (21/26) presentaban prevalencia en la mutación BRAF<sup>V600</sup> y el 19,2% (5/26) eran BRAF<sup>WT</sup>. Estas se clasificaron en tumores metastásicos en ganglio linfático 57,7% (15/26), donde el 86,7% (13/15) presentó BRAF<sup>V600</sup> mutado. El 15,4% (4/26) fueron tumores

metastásicos de cerebro, con el 75% (3/4) de prevalencia por el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado. Por último, 26,9% (7/26) eran tumores en metástasis cutánea, donde el 71,4% (5/7) fueron BRAF<sup>V600</sup> mutado. (Figura 3.2.3.1) (Tabla 3.2.3.1.). En las muestras pareadas, donde se analizó más de una muestra del mismo paciente, se encontró una correlación de la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> del 96% (32/33).



**Figura. 3.2.3.1.**

A. Porcentaje de mutación BRAF<sup>V600</sup> y BRAF<sup>WT</sup> con respecto a la distribución en tumores primarios y tumores metastásicos (%).

B. Distribución en tumores primarios nodulares y en tumores primarios de extensión superficial en porcentajes de la mutación BRAF<sup>V600</sup> y BRAF<sup>WT</sup>

C. Tumores Metastásicos y su distribución en órganos (ganglionar, cerebro y cutánea) con su respectiva correlación en el exón 15 del oncogén BRAF. Prueba estadística X<sup>2</sup>. Se indica el n de la población de cada estudio.



Tabla 3.2.3.1. Análisis clínico-patológico de las biopsias tumorales de MC basado en el status mutacional del oncogén BRAF

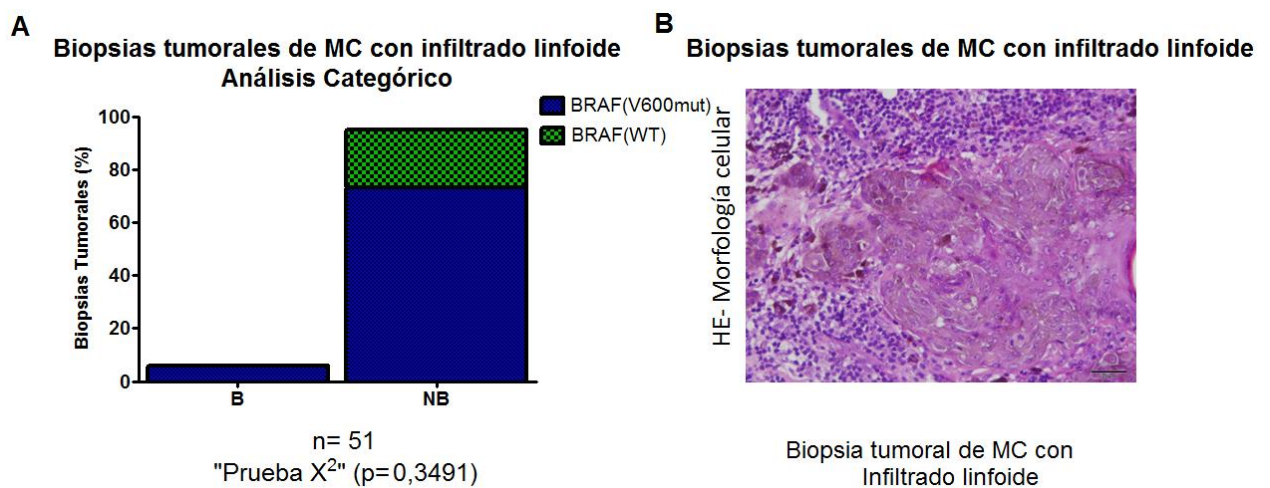
| <i>BRAF Status</i>                               | N                        | <i>BRAF<sup>V600mut</sup></i> | <i>BRAF<sup>WT</sup></i> | <i>Valor p =</i>   |
|--|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|--|
| Biopsias tumorales                               | 51                       | 40                            | 11                       |  |
| <b>MUESTRAS TUMORALES</b>                        |                          |                               |                          |  |
| Primario   | 25                       | 19                            | 6                        | " Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,6789)   |
| Metástasis                                       | 26                       | 21                            | 5                        |  |
| <b>MELANINA</b>                                  |                          |                               |                          |  |
| Expresión de Melanina >25%                       | 11                       | 9                             | 2                        | " Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,7578)   |
| Expresión de Melanina <25%                       | 40                       | 31                            | 9                        |  |
| <b>INFILTRADO LINFOIDE ASOCIADO A TUMOR</b>      |                          |                               |                          |  |
| B  | 3                        | 3                             | 0                        | " Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,3491)   |
| NB   | 48                       | 37                            | 11                       |  |
| <b>TUMORES PRIMARIOS</b>                         |                          |                               |                          |  |
| Nodulares  | 10                       | 8                             | 2                        | " Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,7022)   |
| Extensión superficial                            | 15                       | 11                            | 4                        |  |
| <b>ÍNDICE DE BRESLOW</b>                         |                          |                               |                          |  |
| < 2 mm   | <b>25*</b>               | 14                            | 1                        | *" Prueba exacta de Fisher" (p=0,0225)<br>" Prueba X <sup>2</sup> " (p = 0,0129); "Prueba Mann Whitney" (p=0,2578))" |
| > 2 mm   |                          | 5                             | 5                        |  |
| <b>ULCERACIÓN</b>                                |                          |                               |                          |  |
| Presente   | 14                       | 12                            | 2                        | " Prueba exacta de Fisher " (p=0,3500);<br>" Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,1995)                                      |
| Ausente  | 11                       | 7                             | 4                        |  |
| <b>ÍNDICE PROLIFERATIVO-TUMORES PRIMARIOS</b>    |                          |                               |                          |  |
| Ki-67 > 25%                                      | 18                       | 14                            | 4                        | " Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,5862)" Prueba Mann Whitney" (p =0,1336)   |
| Ki-67 < 25%                                      | 6                        | 4                             | 2                        |  |
| <b>TUMORES METASTÁSICOS</b>                      |                          |                               |                          |  |
| Ganglio linfático                                | 15                       | 13                            | 2                        | " Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,6654)   |
| Cutánea  | 7                        | 5                             | 2                        |  |
| Cerebro  | 4                        | 3                             | 1                        |  |
| <b>METÁSTASIS EN GANGLIO LINFÁTICO</b>           |                          |                               |                          |  |
| Presencia  | <b>44<sup>a</sup> **</b> | 29                            | 4                        | **" Prueba exacta de Fisher" (p=0,0084); **" Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,0036)                                      |
| Ausencia   |                          | 5                             | 6                        |  |
| <b>N<sup>a</sup> GANGLIOS</b>                    |                          |                               |                          |  |
| > 3  | 33                       | 8                             | 0                        | " Prueba exacta de Fisher" (p=0,5503);<br>" Prueba X <sup>2</sup> " (p=0,2275)                                       |
| < 3  |                          | 21                            | 4                        |  |
| <b>ÍNDICE PROLIFERATIVO-TUMORES METASTÁSICOS</b> |                          |                               |                          |  |
| Ki-67 > 25%                                      | <b>38<sup>b</sup> **</b> | 25                            | 3                        | *" Prueba X <sup>2</sup> " (p= 0,0186) y **" Prueba Mann Whitney" (p=0,0089)   |
| Ki-67 < 25%                                      |                          | 5                             | 5                        |  |

a) Para el análisis estadístico de la presencia metástasis en ganglio linfático en relación al status mutacional de BRAF, se consideró la población total del estudio.

b) Para el análisis estadístico del índice proliferativo en relación al status mutacional de BRAF, se consideraron sólo las biopsias donde se determinó el índice proliferativo.

✓ *Infiltrado linfoide*

Tanto para tumores primarios como tumores metastásicos, se analizó la presencia y distribución del infiltrado linfoide asociado a tumor en las 51 biopsias analizadas. La mayoría de los tumores 94,1% (48/51) tenían una presencia moderada de cantidad de linfocitos alrededor del tumor (NB), de los que el 77,1% (37/48) eran positivos para la mutación BRAF<sup>V600</sup>. El 5,9% (3/51) de las biopsias poseían una presencia abundante de linfocitos en el área tumoral (B), siendo el 100% positivos para BRAF<sup>V600</sup> mutado (Figura 3.2.3.2.).

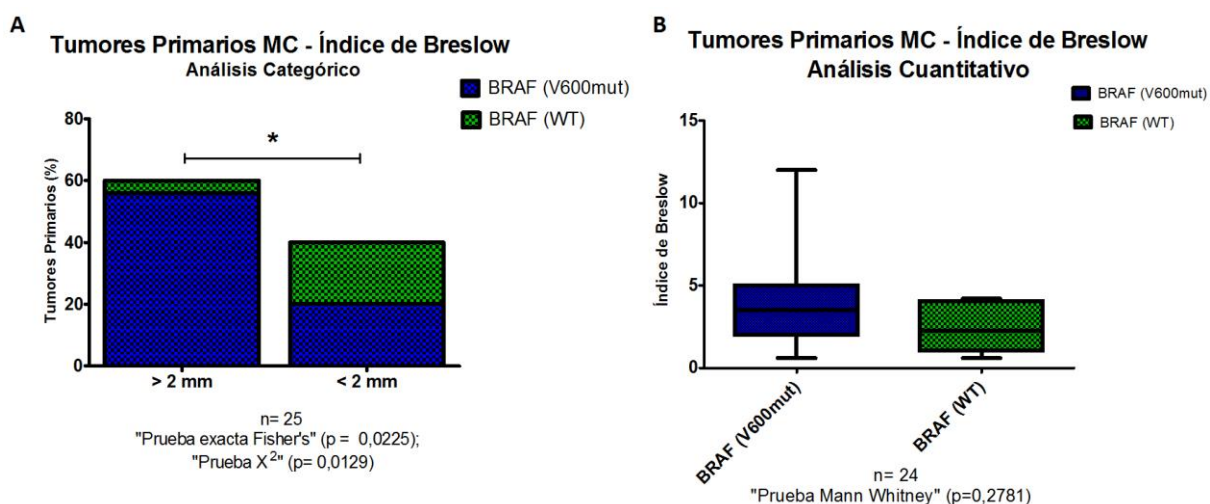


**Figura 3.2.3.2.** A. Porcentaje de biopsias tumorales que presentan una presencia moderada (NB) o abundante (B) de linfocitos alrededor del tumor y su correlación con el oncogén BRAF<sup>V600</sup>. B. Ejemplo representativo de infiltrado linfoide de biopsia tumoral por tinción con HE. Escala: 50µm. Prueba estadística X<sup>2</sup>. Se indica el n de la población de estudio.

### 3.2.3.1. ANÁLISIS DE TUMORES PRIMARIOS

#### 3.2.3.1.1. Índice de Breslow

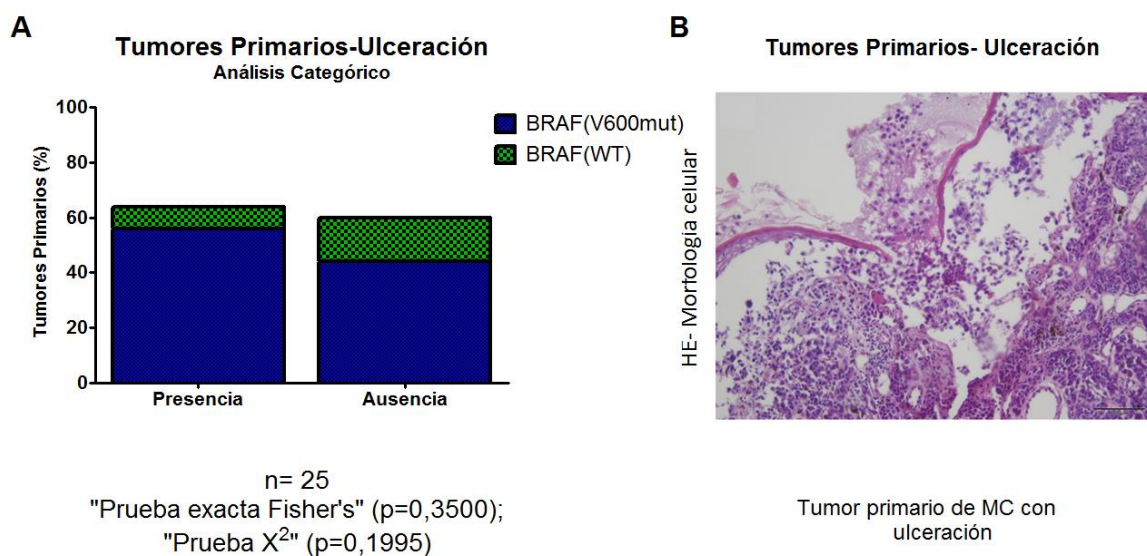
Fueron analizadas un total de 25 biopsias de tumores primarios para su correlación con el oncogén BRAF<sup>V600</sup>. El espesor de los tumores presentó un rango de 0,6-8 mm. El 40% (10/25) presentaron un índice de Breslow  $\leq 2$  mm; el 24% (6/25) entre  $> 2$  mm y  $\leq 4$  mm; y el 36% (9/25) de los melanomas  $> 4$  mm. Para el análisis categórico de contingencia, se realizó un corte en espesor de 2 mm, en donde el 60% (15/25) de los tumores tuvieron un espesor  $> 2$  mm, y entre ellos el 93,3% (14/15) eran BRAF<sup>V600</sup> mutado. Los tumores con índice de Breslow  $\leq 2$  mm correspondieron al 40% (10/25), de los cuales el 50% (5/10) poseían la mutación BRAF<sup>V600</sup>. Esta asociación resultó ser estadísticamente significativa solo al realizar el análisis categórico (“Prueba exacta de Fisher”,  $p=0,0225$ ; “Prueba  $X^2$ ”,  $p = 0,0129$ ). El análisis cuantitativo no muestra una significancia estadística, entre el valor del índice de Breslow y el status mutacional de BRAF (Figura 3.2.3.1.1.1.).



**Figura 3.2.3.1.1.1.** Correlación de la mutación del exón 15 del oncogén BRAF con respecto al índice de Breslow en los tumores primarios analizados. **A.** Análisis categórico con un límite de espesor superior o inferior de 2 mm en tumores primarios que presentan BRAF<sup>V600</sup> y BRAF<sup>WT</sup> (%). Prueba estadística  $X^2$  y Prueba exacta de Fisher. **B.** Análisis cuantitativo de tumores que presentan BRAF<sup>V600</sup> y BRAF<sup>WT</sup>, en relación al índice de Breslow. Prueba Mann Withtney. Se indica el n de la población de cada estudio. Rango del índice de Breslow de 0,6- 8 mm y una mediana de 2,75mm.

### 3.2.3.1.2. Ulceración

La presencia de ulceración en los tumores primarios fue del 56% (14/25), y de estos tumores ulcerados el 85,7% (12/14) presentaron la mutación BRAF<sup>V600</sup>. El 44% (11/25) de tumores no presentaron ulceración con un 63,6% (7/11) de prevalencia por la mutación BRAF<sup>V600</sup>. No se encontró una relación significativa entre el estado mutacional de BRAF<sup>V600</sup> y la ulceración de los tumores primarios (Figura 3.2.3.1.2.1.).

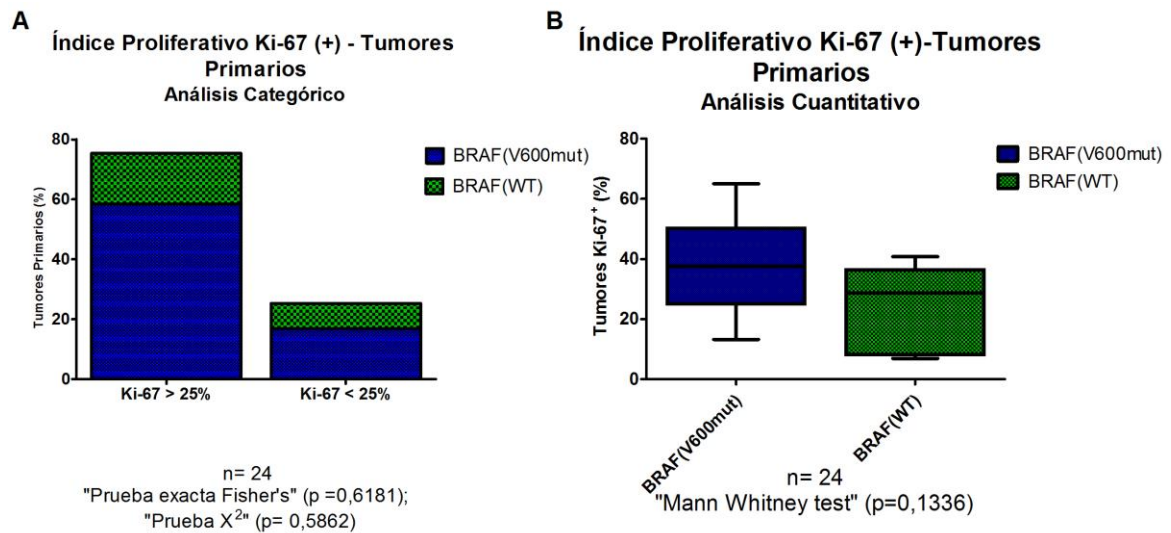


**Figura 3.2.3.1.2.1.** Distribución de tumores primarios con presencia o ausencia de ulceración con respecto al estado mutacional en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> (%). Prueba estadística X<sup>2</sup> y prueba exacta de Fisher. Se indica el n de la población de estudio. **B.** Ejemplo representativo de ulceración en una biopsia de tumor primario por tinción con HE. Escala: 100µm.

### 3.2.3.1.3. Índice Proliferativo en Tumores Primarios

Para el análisis del índice proliferativo en tumores primarios, medido por la expresión de Ki-67(+) por IHQ y cuantificación como se detalla en materiales y métodos, 24 biopsias tumorales fueron analizadas. Estas fueron categorizadas, con un límite inferior o superior al 25%. El 75% (18/24) presentaron un índice proliferativo > 25%, donde la prevalencia de la mutación BRAF<sup>V600</sup> fue del 77,8% (14/18). El 25%

(6/24) de los tumores presentaban índice proliferativo < 25%, y en estos un 66,7% (4/6), presentaban la mutación BRAF<sup>V600</sup>. Además se realizó el análisis cuantitativo, pero no se encontró una asociación significativa con el índice proliferativo de los tumores primarios y la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado. (Figura 3.2.3.1.3.1.)



**Figura 3.2.3.1.3.1. A.** Porcentaje de Tumores primarios de MC, con un índice proliferativo superior o inferior a 25%, y su correlación con el estado mutacional del oncogén BRAF. Prueba estadística  $X^2$  y prueba exacta de *Fisher*. **B.** Análisis cuantitativo del índice proliferativo en biopsias con tumores primarios con mutación BRAF<sup>V600</sup> y BRAF<sup>WT</sup>. Prueba estadística *Mann Whitney*. Se indica el n de la población analizada. Rango de proliferación celular del 7 al 65,1% con una mediana del 34,6%.

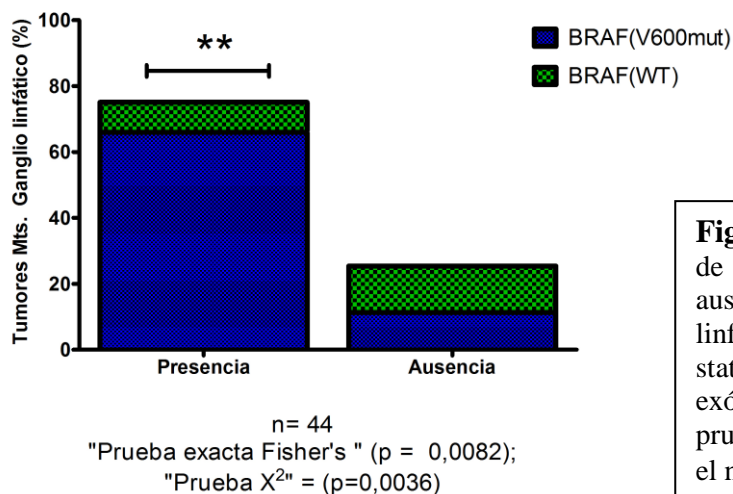
### 3.2.3.2. ANÁLISIS TUMORES METASTÁSICOS

Los 44 pacientes fueron analizados por presencia o ausencia de tumores metastásicos, donde el 90% (40/44) de la población en estudio presentó tumores metastásicos, con una prevalencia en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado del 77%.

#### 3.2.3.2.1. Metástasis en Ganglio linfático

La presencia de metástasis ganglionar en los 44 pacientes, tuvo una prevalencia del 75% (33/44), de estos el 87,9% (29/33) fueron positivos para la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup>. Se encontró una asociación positiva entre éstas variables que resultó estadísticamente significativa ("*Prueba exacta Fisher's*",  $p = 0,0082$ ; "*Prueba  $X^2$* ",  $p=0,0036$ ) (Figura 3.2.3.2.1.1.). El 25% (11/44) de los pacientes no presentaron metástasis en ganglio linfático.

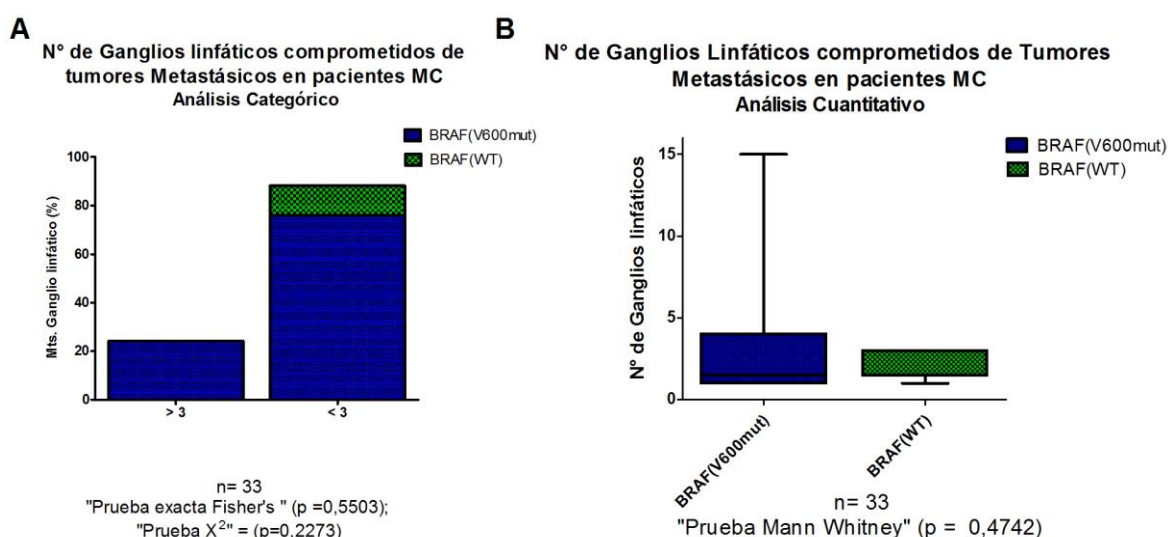
**Pacientes MC con Metástasis en Ganglio linfático**  
Análisis Categórico



**Figura 3.2.3.2.1.1.** Porcentaje de pacientes con presencia o ausencia de metástasis en ganglio linfático, y su relación con el status mutacional de BRAF en el exón 15. Prueba estadística  $X^2$  y prueba exacta de Fisher. Se indica el n de la población analizada.

### 3.2.3.2.2. Número de Ganglios linfáticos comprometidos con metástasis de MC

Los 33 pacientes con metástasis ganglionar analizados presentaron un rango de 1 a 15 ganglios linfáticos comprometidos con una mediana de 2 ganglios linfáticos. Los mismos fueron categorizados con un límite inferior o superior a 3 ganglios linfáticos, encontrándose que el 24,2% (8/33) presentaban un número de ganglios superior a 3 y en éstos la prevalencia de la mutación BRAF<sup>V600</sup> fue del 100%. El 75,8% (25/33) de los pacientes con menos de 3 ganglios comprometidos, presentaron la mutación BRAF<sup>V600</sup> en un 84% (21/25). No se encontró una significancia estadística de asociación entre el número de ganglios linfáticos comprometidos y la mutación BRAF<sup>V600</sup> (Figura 3.2.3.2.2.1).

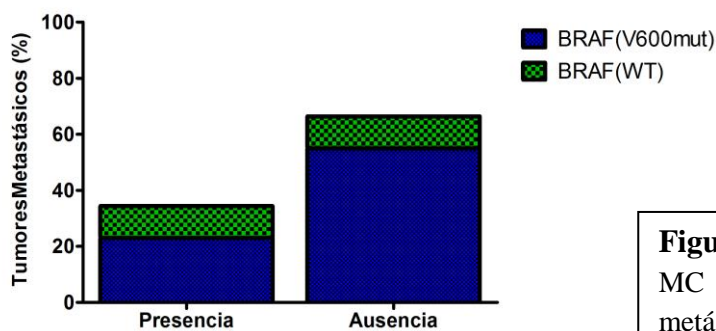


**Figura 3.2.3.2.2.1.** Porcentaje de número de ganglios con metástasis y su relación categórica y cuantitativa con respecto al oncogén BRAF. **A.** Análisis categórico del número de ganglios en un límite superior e inferior a 3 y su respectiva correlación con la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup>. Prueba estadística  $\chi^2$  y prueba exacta de Fisher. **B.** Variable cuantitativa del número de ganglios y su porcentaje en BRAF<sup>V600</sup> y BRAF<sup>WT</sup>. Prueba estadística Mann Whitney. Se indica el n de la población de estudio. Rango de 1 a 15 ganglios linfáticos con una mediana de 2.

### 3.2.3.2.3. Otros Tumores Metastásicos

Adicionalmente se analizó si los 44 pacientes estudiados desarrollaron otro tipo de metástasis en otros sitios, fuera de los ganglios linfáticos (otras metástasis). Estos casos se distribuyeron en metástasis en tránsito y metástasis a distancia. El 34,1% (15/44) de los pacientes presentaron otras metástasis, y de éstos el 66,7% (10/15) poseían la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup>. El 65,9% (29/44) de los pacientes no desarrollaron otras metástasis (Figura 3.2.3.3.1).

**Pacientes MC con presencia de otras metástasis**  
**Análisis Categórico**



n = 44  
 "Prueba exacta Fisher's" ( $p = 0,2798$ );  
 "Prueba  $X^2$ " ( $p = 0,2273$ )

**Figura 3.2.3.3.1.** Pacientes con MC que desarrollaron otras metástasis (%), ya sean en tránsito o distancia. Prueba estadística  $X^2$  y prueba exacta de Fisher. Se indica el n de la población de estudio.

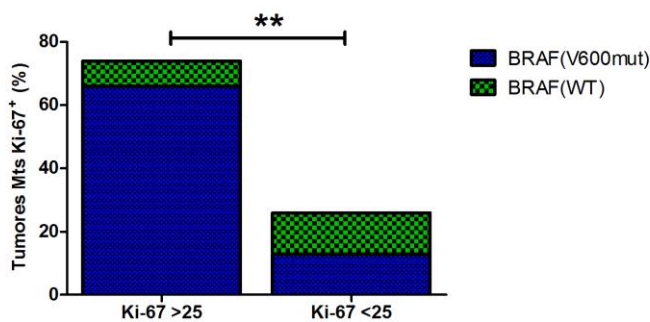
### 3.2.3.2.4. Índice Proliferativo en Tumores Metastásicos

Para el análisis estadístico del índice proliferativo en relación al *status* mutacional de BRAF, se consideraron sólo las biopsias donde se determinó el índice proliferativo en los tumores metastásicos. Un total de 38 biopsias fueron analizadas en esta categoría, donde se encontró una prevalencia de la mutación BRAF<sup>V600</sup> del 79% (30/38). Estos resultados mostraron una asociación significativa entre el índice proliferativo en tumores metastásicos y la mutación BRAF<sup>V600</sup>, tanto en las variables categóricas como en las variables cuantitativas, con un "Prueba  $X^2$ " ( $p = 0,0089$ ) y "Prueba Mann Whitney" ( $p = 0,0186$ ).



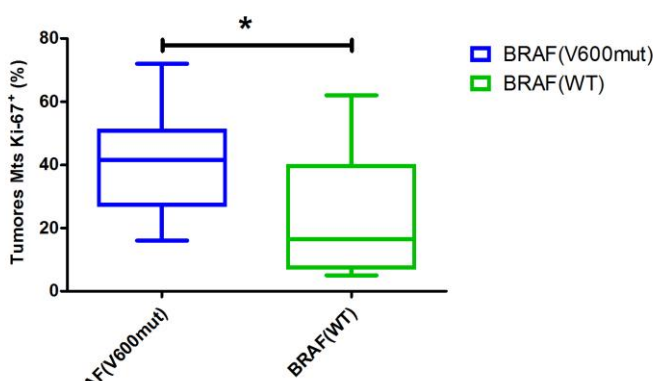
Para el análisis categórico se realizó un corte inferior y superior al 25% de células tumorales Ki-67 (+). El 79% (28/38) de los tumores presentó un índice proliferativo superior del 25%, con la prevalencia en la mutación BRAF<sup>V600</sup> del 89% (25/28). El 21% (6/25), fueron tumores con un índice proliferativo menor a 25%, en el que 50% (5/10) resultón BRAF<sup>V600</sup> mutado (Figura 3.2.3.2.4.1.).

**A** Índice Proliferativo -Ki-67 (+) en Pacientes MC con Tumores Metastásicos  
Análisis Categórico



n= 38  
"Prueba exacta Fisher's" (p=0,0186);  
"Prueba X<sup>2</sup>" (p=0,0089)

**B** Índice Proliferativo Ki-67 (+) en Pacientes MC con Tumores Metastásicos  
Análisis Cuantitativo



n= 38  
"Prueba Mann Whitney" (p=0,0209)

**Figura 3.2.3.2.4.1.** Índice proliferativo de tumores metastásicos y su correlación con la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup>.

**A.** Categorización del índice proliferativo Ki-67 (+) en un límite inferior o superior del 25% y su correlación con la mutación en el exón 15 el oncogén BRAF<sup>V600</sup>. Prueba estadística X<sup>2</sup> y prueba exacta de Fisher.

**B.** Porcentaje de la variable cuantitativa índice proliferativo Ki-67 (+) y su relación con el oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado. Prueba estadística Mann Whitney. Se indica el n de la población de estudio. Rango de proliferación celular del 5 al 72% con una mediana del 50%

## ***CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES***

El melanoma cutáneo es el cáncer de piel con mayor incremento en su incidencia. Presenta una alta tasa de mutaciones, siendo la más relevante la mutación nucleotídica T1799A, sustitución aminoacídica (V600E) del oncogén BRAF. La proteína serina-treonina quinasa BRAF<sup>V600E</sup> es una variante constitutivamente activa asociada positivamente a la proliferación celular por la vía MAPK (Davies et al. 2002). En las líneas celulares de MC humano establecidas en nuestro laboratorio hay variantes BRAF<sup>V600E</sup> (8/16), BRAF<sup>V600K</sup> (4/16) y BRAF<sup>WT</sup>(4/16); presentando las líneas BRAF<sup>V600E</sup> mayor índice proliferativo y clonogénico *in vitro* (Chervo F. 2014). Dada su relevancia, se analizó el *status* mutacional del oncogén BRAF en biopsias tumorales de una población de pacientes con MC en estadios clínicos II, III y IV del Instituto Alexander Fleming (n=44). Para ello, se estableció una metodología de trabajo: desde la extracción de ADN tumoral a partir de biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina, hasta la amplificación del exón 15 del oncogén BRAF y posterior análisis de su secuencia por el método de Sanger. Esta metodología fue optimizada para la extracción de ADN, con mejoras en la cantidad y calidad del mismo, mediante la combinación de calor y rehidratación paulatina de la biopsia tumoral fijada en formol y embebida en parafina, porque posiblemente, esta rehidratación omite el daño mecánico que se puede producir al manipular el ADN de las muestras fijadas en formol. Los pasos de purificación y precipitación eliminaron eficientemente los inhibidores de la PCR, dando un mejor rendimiento en la secuenciación de Sanger, obteniendo cromatogramas limpios. Otros trabajos realizados sobre la eficiencia de extracción de ADN en biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina, sugieren limitantes de calidad y cantidad de ADN a factores como el fijador (naturaleza, concentración, temperatura, pH), tiempo de fijación, tamaño del tejido fijado y edad de la pieza, y por lo que se sugiere la rehidratación del tejido tumoral (Jiménez G et al. 2007)(Zain et al 2015). Además, en los casos en los que el infiltrado linfoide o tejido no tumoral es abundante en la biopsia de estudio, el uso de la microdissección láser permitió aislar eficazmente la sección de tejido tumoral, evitando así el escape de mutaciones presentes en el ADN tumoral por su dilución con ADN de tejido no tumoral, obteniendo resultados más confiables. En el presente estudio, el *status* mutacional de BRAF había sido previamente determinado por medio de la prueba de diagnóstico molecular *Cobas 4800*, para 8 pacientes y los resultados fueron luego confirmados en el 100% de los casos por Secuenciación de Sanger. Después de determinar el *status* mutacional del oncogén BRAF en cada biopsia, se analizó su relación con características clínico-patológicas del tumor.

La frecuencia de mutaciones en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> varía entre las diferentes regiones y grupos de pacientes con MC (Lee et al. 2012) (Inumaru et al. 2014). En el presente estudio, la población de pacientes con MC analizada presentó una frecuencia del oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado del 77%, la mutación más frecuente hallada fue la mutación BRAF<sup>V600E</sup> con un 98%; el resto de los pacientes presentó BRAF<sup>V600K</sup>. La frecuencia de mutaciones en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> resultó ser mayor que lo reportada en bibliografía (30-72%) (Inumaru et al. 2014)(Cheng, P. Chu, M. Hinshaw, K. Smith, J. Maize 2011) (Tschandl et al. 2013)(Rutkowski et al. 2014). Esto puede deberse bien a la procedencia de la población de estudio analizada, porque Argentina es una nación con diversidad poblacional, con diferencias en el tipo de etnia predominante por las diversas regiones en el país y por las inmigraciones principalmente de la población Europea (Latorre C., Loria F. 2011). En un estudio sobre población italiana se determinó una frecuencia del oncogén BRAF<sup>V600</sup> del 72% (Venesio et al. 2008). Otra posible explicación que podría contribuir al fenómeno observado, es que la población de estudio comprende pacientes con MC estadios clínicos II, III y IV, por lo que en muchos de los casos, los tumores tuvieron tiempo de evolución prolongado y dada la alta heterogeneidad observada en MC pueden haber surgido durante dicho tiempo nuevos subclones con mutación en BRAF<sup>V600</sup> (Yancovitz et al. 2012)(Tschandl et al. 2013). En este estudio la mayoría de los pacientes fueron inicialmente diagnosticados con estadio III (75%), con una prevalencia por la mutación BRAF<sup>V600E</sup> del 82%, aunque no se encontró una asociación del *status* mutacional de BRAF<sup>V600</sup> a un estadio clínico en particular.

En cuanto a la evolución clínica de los pacientes, no se encontró una asociación estadísticamente significativa con respecto al *status* mutacional del oncogén BRAF<sup>V600</sup> con la sobrevida libre de enfermedad o sobrevida total en los pacientes analizados. Es posible que dada la alta prevalencia de BRAF<sup>V600</sup> mutado en la población de estudio (77%), no fuera posible hallar dicha asociación. Debe tenerse en cuenta además, que los pacientes analizados no corresponden a pacientes sin tratamiento (evolución natural de la enfermedad), sino a pacientes que recibieron tratamientos de inmunoterapia.

Al analizar las características disponibles de los pacientes como edad y sexo, no se encontró una asociación con el status mutacional de BRAF. Otros estudios realizados en pacientes con MC, mostraron una asociación significativa entre una edad joven menor a 40 años y la mutación en el oncogén BRAF<sup>V600</sup> (Lee et al. 2012)(Schlaak et al. 2013).

Con respecto a las características histopatológicas de los tumores, se analizó una serie de características generales y particulares según la biopsia analizada fuera un tumor primario, metástasis en ganglio linfático o metástasis a distancia. Cuando analizamos las características generales de los tumores, como la expresión de melanina y la presencia o distribución del infiltrado linfoide presente en el tumor, no encontramos una asociación significativa con respecto a la mutación en BRAF<sup>V600</sup>, datos similares han sido reportados en bibliografía por algunos autores (Inumaru et al. 2014)(Meckbach, Keim, et al. 2014). Otros trabajos han encontrado una asociación significativa entre la mutación del oncogén BRAF<sup>V600E</sup> y las características como producción de pigmento (melanina), en pacientes con tumores primarios (Liu et al. 2007), sin embargo probablemente debido al número limitado de tumores analizados, no hallamos dicha asociación.

En relación a los tumores primarios, fueron analizadas 25 biopsias, donde se encontró una prevalencia de la mutación BRAF<sup>V600</sup> del 76%. Se halló una relación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow (espesor del tumor) y la mutación BRAF<sup>V600</sup>, considerando una categorización con un índice de Breslow mayor a 2 mm (prueba estadística  $X^2$ ,  $p=0,012$ ). Estos resultados están en concordancia a lo reportado previamente (Picard et al. 2014)(Ardekani S et al. 2013). Además, otros autores reportaron una asociación significativa entre BRAF<sup>V600</sup> mutado, el índice proliferativo y el índice de Breslow en tumores primarios, con un impacto en la supervivencia de los pacientes (Long et al 2011)(Lemech, Infante, and Arkenau 2012)(Lee et al. 2014). Otros autores también han mostrado una asociación significativa entre la ulceración del tumor primario y la mutación BRAF<sup>V600</sup>, apuntando así a una mayor agresividad de los tumores con mutación de BRAF (Davies et al. 2002)(Ardekani S et al. 2013). En nuestra población de estudio, no se encontró una asociación con respecto a la ulceración y el status mutacional del oncogén BRAF.

La presencia del oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado en el MC es considerado por algunos autores como un indicador de mal pronóstico debido a que dichos tumores poseen una tendencia a generar metástasis más rápido en órganos a distancia (*Greene et al. 2009*)(*Barbour et al. 2014*), principalmente en el estadio III de la enfermedad (*Moreau et al. 2012*)(*Picard et al. 2014*). En nuestro estudio, analizando la población total de pacientes, se encontró una asociación significativa entre la mutación BRAF<sup>V600</sup> con respecto a la presencia de metástasis de MC en ganglio linfático, estos resultados están en concordancia con trabajos previos (*Picard et al. 2014*). Además, el número de ganglios linfáticos positivos y BRAF<sup>V600</sup> mutado, han demostrado ser el factor pronóstico más significativo del estadio III del melanoma (*Balch et al. 2009*)(*Barbour et al. 2014*) (*Picard et al. 2014*). También en la población de pacientes con tumores metastásicos analizada, se encontró una correlación significativa positiva entre el índice proliferativo (Ki-67<sup>+</sup>) con respecto al *status* mutacional de BRAF<sup>V600</sup>, tanto por análisis de variables cuantitativas como categóricas. Esto puede deberse a que la mutación en BRAF<sup>V600</sup> lleva a una activación constitutiva de la vía MAPK y por ende del ciclo celular, lo que se traduce en un aumento de la expresión de la proteína Ki-67, en un aumento de la proliferación celular y por ende en una aceleración de la progresión de la enfermedad. No se encontró una asociación entre la mutación BRAF<sup>V600</sup> y el número de ganglios linfáticos comprometidos con metástasis en este estudio, debido a que la mayoría de pacientes analizados en esta categoría presentaban menos de 3 ganglios linfáticos comprometidos con metástasis en MC. Sin embargo, la mayor proliferación celular puede ser responsable de una propagación metastásica. Se ha reportado que los tumores de MC presentan alta heterogeneidad, y la adquisición continua de estas alteraciones pueden dar lugar a la aparición de subclones del tumor con diferentes ventajas fenotípicas (por ejemplo, la invasión, proliferación, capacidad para colonizar diferentes órganos, etc.) (*Yancovitz et al. 2012*). Esta propuesta es apoyada por los diferentes estudios que reportan mayor tasa de mutación BRAF<sup>V600</sup> en los tumores metastásicos que en los tumores primarios de melanoma cutáneo (*Venesio et al. 2008*)(*Moreau et al. 2012*)(*Ardekani S et al. 2013*)(*Ekedahl et al. 2013*)(*Barbour et al. 2014*) (*Picard et al. 2014*).

Las principales conclusiones de este estudio fueron:

- La población de pacientes con MC (estadios clínicos II, III y IV) presentó una frecuencia del 77% del oncogén BRAF<sup>V600</sup> mutado mayor que la reportada en bibliografía, con una prevalencia de la mutación por BRAF<sup>V600E</sup> del (98%) sobre BRAF<sup>V600K</sup> del (2%).
- En los tumores primarios, la mutación en BRAF<sup>V600</sup> presentó una asociación significativa con parámetros clínicos-patológicos relacionados a la progresión tumoral como el índice de Breslow, cuando éste es mayor a 2mm de espesor.
- En los tumores metastásicos, la mutación en BRAF<sup>V600</sup> presentó una asociación significativa con parámetros clínicos-patológicos relacionados a la progresión tumoral como la presencia de metástasis de MC en ganglios linfáticos y el índice proliferativo de los tumores metastásicos.
- No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con otras características clínico-patológicas ni con la evolución clínica en la población de estudio.

Este estudio sugiere la ampliación del número de casos a analizar, para contribuir a una mejor comprensión de la patogénesis molecular del MC, para excluir los errores aleatorios debido al limitado número de casos, y poder obtener una mayor proporción de tumores que presenten al oncogén BRAF<sup>WT</sup>. Los resultados obtenidos en este estudio abren la posibilidad de considerar el *status* mutacional del oncogén BRAF como un factor pronóstico, con el fin de mejorar la estadificación del MC.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



- American Cancer Society. 2014. "Qué Es El Cáncer de Piel Tipo Melanoma." *AJCC Cancer Staging Manual*.  
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepieltipomelanoma/guiadetallada/cancer-de-piel-tipo-melanoma-what-is-what-is-melanoma>.
- American Cancer Society Inc. 2015. "Cancer Facts & Figures 2015." *Atlanta: American Cancer Society*: 30303–2 (26).
- Ardekani S et al. 2013. "Disease Progression and Patient Survival Are Significantly Influenced by BRAF Protein Expression in Primary Melanoma." *British Journal of Dermatology* 169: 320–28.
- Aris M et al. 2013. "Vacuna Terapéutica CSF-470 Para Melanoma Cutáneo." *Act Terap Dermatol* 36: 40–40.
- Aris M et al. 2012. "MART-1- and gp100-Expressing and -Non-Expressing Melanoma Cells Are Equally Proliferative in Tumors and Clonogenic in Vitro." *J Invest Dermatol*: 132, 365.
- Aris, Mariana, and MarÃa Marcela Barrio. 2015. "Combining Immunotherapy with Oncogene-Targeted Therapy: A New Road for Melanoma Treatment." *Frontiers in Immunology* 6: 46.
- Aris, Mariana, María Marcela Barrio, and José Mordoh. 2012. "Lessons from Cancer Immunoediting in Cutaneous Melanoma." *Clinical and Developmental Immunology*: 192719,14.
- Aris, M. M. Barrio, J. Mordoh. 2012. "Lessons from Cancer Immunoediting in Cutaneous Melanoma." *Clin Dev Immunol*: 192719.
- Aris, M. T., I.J.; Mordoh, J.; Barrio, M.M. 2013. "Cutaneous melanoma: molecular biology, risk factors and treatment options." *N-publishers*: 39–65.
- Aris, M.M.; Mordoh J. 2010. "Cutaneous Melanoma: A Test Field for Immunotherapy and a Medical Challenge." *Current Cancer Therapy Reviews*: 6, 229.
- Balch, Charles M. et al. 2009. "Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification." *Journal of Clinical Oncology* 27(36): 6199–6206.
- Balch et al, Charles M; Mihm Martin; et. 2010. "Melanoma and the Impact of Mitotic Rate." *Skin Cancer Foundation* 28: 3.
- Barbour, Andrew P et al. 2014. "BRAF Mutation Status Is an Independent Prognostic Factor for Resected Stage IIIB and IIIC Melanoma: Implications for Melanoma Staging and Adjuvant Therapy." *European Journal of Cancer* 50: 2668–76.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.06.009>.
- Barrio M et al. 2006. "A Phase I Study of an Allogeneic Cell Vaccine (VACCIMEL) with GM-CSF in Melanoma Patients." *J Immunother*: 29, 444.
- Barrio, María Marcela. 2009. "Melanoma E Inmunidad." *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 43(3): 351–55.

- BLAST. 2015. "BLAST Assembled Genomes." [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT\\_SEQUENCE=NG\\_007873.3&LINK\\_LOC=nucore](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT_SEQUENCE=NG_007873.3&LINK_LOC=nucore).
- Boiko, Alexander D et al. 2010. "Human Melanoma-Initiating Cells Express Neural Crest Nerve Growth Factor Receptor CD271." *Nature* 466(7302): 133–37. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09161>.
- Botella-Estrada, R, and O Sanmartín Jiménez. 2010. "New Therapies Targeting the Genetic Mutations Responsible for Different Types of Melanoma." *Actas dermo-sifiliograficas* 101(5): 394–400.
- Brahmer et al. 2012. "Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer." *New England Journal of Medicine*: 366, 2455.
- Brentjens, Renier et al. 2013. "CD 19-Target T Cell Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia." 5(177).
- Cantwell-Dorris, Emma R, John J O'Leary, and Orla M Sheils. 2011. "BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy." *Molecular cancer therapeutics* 10: 385–94.
- Carlino M et al. 2014. "Correlation of BRAF and NRAS Mutation Status with Outcome, Site of Distant Metastasis and Response to Chemotherapy in Metastatic Melanoma." *british journal of cancer* 287: 111, 292–99.
- Chapman, Paul B et al. 2011. "Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation." *The New England journal of medicine* 364: 2507–16.
- Cheng, P. Chu, M. Hinshaw, K. Smith, J. Maize, A. Sferruzza; 2011. "Frequency of Mutations Associated with Targeted Therapy in Malignant Melanoma Patients. 2011 ASCO Annual Meeting.pdf." *J Clin Oncol*: 29 (suppl; abstr 8597).
- Chervo F. 2014. "Caracterización Biológica, Genética Y Antigenética de Líneas Celulares de Melanoma Cutaneo Humano."
- Chin, Lynda, Levi a Garraway, and David E Fisher. 2006. "Malignant Melanoma : Genetics and Therapeutics in the Genomic Era Malignant Melanoma : Genetics and Therapeutics in the Genomic Era." *genes & development* 20: 2149–82.
- Clark, W H et al. 1989. "Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression." *Journal of the National Cancer Institute* 81(24): 1893–1904.
- Curry, Jonathan L. et al. 2012. "Molecular Platforms Utilized to Detect BRAF V600E Mutation in Melanoma." *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*: 267–73.
- Davies, Helen et al. 2002. "Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer." *Nature* 417(6892): 949–54.
- Day, C L et al. 1981. "Malignant Melanoma. Prognostic Significance of 'Microscopic Satellites' in the Reticular Dermis and Subcutaneous Fat." *Annals of surgery* 194: 108–12.

- Desmond R., Soong. S. 2003. "Epidemiology of Malignant Melanoma of the Skin." *Surgical Clinic of North America* 87(8): 651–58.
- Dickson P &, Gershenwald. 2011. "Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma." *Surgical Oncology* 20(1): 1–17.
- E. M. von Euv et al. 2008. "A Phase I Clinical Study of Vaccination of Melanoma Patients with Dendritic Cells Loaded with Allogeneic Apoptotic/necrotic Melanoma Cells. Analysis of Toxicity and Immune Response to the Vaccine and of IL-10 -1082 Promoter Genotype as Predictor of Diseases." *J Transl Med*: 6, 6.
- Eddy, D.J. 2003. "Surgical Treatment of Melanoma." *British Journal of Dermatology* 149: 2–12.
- Ekedahl, H. et al. 2013. "The Clinical Significance of BRAF and NRAS Mutations in a Clinic-Based Metastatic Melanoma Cohort." *British Journal of Dermatology* 169(5): 1049–55.
- Falchook G et al. 2012. "RAF Inhibitor Dabrafenib (GSK2118436) Is Active in Melanoma Brain Metastases, Multiple BRAF Genotypes and Diverse Cancers." *Lancet* 29(6): 997–1003.
- Fitzpatrick, T. B. 1988. "The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I through VI." *Arch. Dermatol.* 124: 869–71.
- Flaherty, Keith T. 2011. "Is It Good or Bad to Find a BRAF Mutation?" *Journal of Clinical Oncology* 29(10): 1229–30.
- Flaherty. et al. 2012. "Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma." *New England Journal of Medicine* 367(2): 107–14.
- Gajewski, J. Louahed, V. G. Brichard. 2010. "Gene Signature in Melanoma Associated with Clinical Activity: A Potential Clue to Unlock Cancer Immunotherapy." *Cancer J* 16, 399.
- Galon J et al. 2012. "Cancer Classification Using the Immunoscore: A Worldwide Task Force." *J Transl Med* 10, 205.
- Gandini, Sara et al. 2011. "Hormonal and Reproductive Factors in Relation to Melanoma in Women: Current Review and Meta-Analysis." *European Journal of Cancer* 47(17): 2607–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.04.023>.
- Genetically informed Cancer Medicine. 2015. "My Cancer Genomics." <http://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/kit/95/>.
- Gerber AL, Müntz A, Schlapbach C, Shafiqi M, Kiermeir D, Hüsler R, Hunger RE. Br. 2014. "High Expression of FOXP3 in Primary Melanoma Is Associated with Tumour Progression." *J Dermatol*: Jan;170(1):103–9.
- Gershenwald, Soong, and Balch. 2010. "2010 TNM Staging System for Cutaneous Melanoma." *Forum for Nordic Dermato-Venerology* 15(March): 47–48.
- Greene, Marcella M Johnson, Elizabeth A Grimm, and Julie A Ellerhorst. 2009. "Frequencies of NRAS and BRAF Mutations Increase from the Radial to the Vertical Growth Phase in Cutaneous Melanoma." *The Journal of investigative dermatology* 129(6): 1483–88.

- Greene, M. H. et al. 1985. "High Risk of Malignant Melanoma in Melanoma-Prone Families with Dysplastic Nevi." *Annals of Internal Medicine* 102(4): 458–65.
- Handolias D et al. 2010. "Mutations in KIT Occur at Low Frequency in Melanomas Arising from Anatomical Sites Associated with Chronic and Intermittent Sun Exposure." *Pigment Cell and Melanoma Research* 23(2): 210–15.
- Hodi F. S. et al. 2010. "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma." *N Engl J Med*: 363, 711.
- Houben, Roland et al. 2004. "Constitutive Activation of the Ras-Raf Signaling Pathway in Metastatic Melanoma Is Associated with Poor Prognosis." *Journal of carcinogenesis* 3: 6.
- Huang, Tianguai, Jian Zhuge, and Wenyong W Zhang. 2013. "Sensitive Detection of BRAF V600E Mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR." *BioMed Central*: 1–3.
- Hwu et al. 2012. "Safety and Activity of anti-PDL1 Antibody in Patients with Advanced Cancer." *N Engl J Med* .: 366(26):2455–65.
- Institute National of Cancer (NCI). 2015. "Institute National of Cancer NCI." *Institute National of Cancer (INC)*.  
[http://www.cancer.gov/espanol/pdq/deteccion/piel/HealthProfessional/page2#\\_88\\_toc](http://www.cancer.gov/espanol/pdq/deteccion/piel/HealthProfessional/page2#_88_toc).
- Inumaru, J S S, K I F Gordo, A C Fraga Junior, and A M T C Silva. 2014. "Analysis of the BRAF V600E Mutation in Primary Cutaneous Melanoma." *GMR Genetics and Molecular Research* 13(2): 2840–48.
- J. Miller, and C. Mihm. 2006. "Melanoma." *The New England journal of medicine*: 51–65.
- Jiménez G, Maria Villalobos, Ernesto Jimenez, and Walter Plama. 2007. "Determinación de La Efectividad de Cinco Protocolos de Extracción de ADN a Partir de Material Parafinado Para Estudios Moleculares ." *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica* 1(1): 10–19.
- Kirkwood J. M. et al. 2009. "Immunogenicity and Antitumor Effects of Vaccination with Peptide Vaccine +/- Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor And/or IFN-alpha2b in Advanced Metastatic Melanoma: Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696." *Clin Cancer Res*: 15, 1443.
- Kluger, Harriet M et al. 2012. "A Phase II Trial of Desatinib in Advanced Melanoma." *NIH Public Acces* 117(10): 2202–8.
- Ladstein, Rita G, Ingeborg M Bachmann, Oddbjørn Straume, and Lars A Akslen. 2010. "Ki-67 Expression Is Superior to Mitotic Count and Novel Proliferation Markers PHH3, MCM4 and Mitosin as a Prognostic Factor in Thick Cutaneous Melanoma." *BMC cancer* 10: 140.
- Latorre C., Loria F., y Dora. 2011. "Melanoma Cutáneo : Mortalidad Y Características de Los Tumores Incidentes En Los Dos Extremos de La Vida En La Argentina." 18(1): 30–35.
- Lee, Hyoun Wook et al. 2012. "Frequency of BRAF Mutation and Clinical Relevance for Primary Melanomas." *Korean Journal of Pathology* 46: 246–52.

- Lee, Dae-Cheol Kim, Ki-Ho Kim, and Ki-Hoon Song. 2014. "Prognostic and Clinicopathologic Associations of BRAF Mutation in Primary Acral Lentiginous Melanoma in Korean Patients: A Preliminary Study." *BRAF Mutation in ALM Ann Dermatol* 26(2): 195–202. <http://dx.doi.org/10.5021/ad.2014.26.2.195>.
- Lemech, C, J Infante, and HT Arkenau. 2012. "The Potential for BRAF V600 Inhibitors in Advanced Cutaneous Melanoma: Rationale and Latest Evidence." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 4(2): 61–73.
- Lin, Jennifer Y, and David E Fisher. 2007. "Melanocyte Biology and Skin Pigmentation." *Nature* 445(February): 843–50.
- Liu, Wendy et al. 2007. "Distinct Clinical and Pathological Features Are Associated with the BRAF(T1799A(V600E)) Mutation in Primary Melanoma." *The Journal of investigative dermatology* 127: 900–905.
- Long et al. 2011. "Morphologic and Immunohistochemical (IHC) Changes in Metastatic Melanoma (MM) Tissue and Associations with Clinical Outcome in Patients (pts) on BRAF Inhibitors (BRAFi)." *J Clin Oncol* 29: 8542.
- Long, Georgina V. et al. 2011. "Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic BRAF in Metastatic Melanoma." *Journal of Clinical Oncology* 29: 1239–46.
- Loria, Di, A González, and C Latorre. 2009. "Cutaneous Melanoma Epidemiology in Argentina: Analysis from the Argentine Cutaneous Melanoma Registry." *Dermatología Argentina* 14(2): 436–42.
- Lynch, H T, B C Fritchot, and J F Lynch. 1978. "Familial Atypical Multiple Mole-Melanoma Syndrome." *Journal of medical genetics* 15(5): 352–56.
- Markovic, Svetomir N et al. 2007. "Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis." *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* 82(March): 364–80.
- Martí R, M., A. Sorolla, and A. Yeramian. 2012. "Nuevas Dianas Terapéuticas En El Melanoma." *Actas Dermo-Sifiliograficas* 103(7): 579–90.
- Mcgettigan S. 2014. "Dabrafenib: A New Therapy for Use in." *Pract. Oncology* 5(3): 211–75.
- Meckbach, Diana, Ulrike Keim, et al. 2014. "BRAF-V600 Mutations Have No Prognostic Impact in Stage IV Melanoma Patients Treated with Monochemotherapy." *PLoS ONE* 9(2).
- Meckbach, Diana, Jürgen Bauer, et al. 2014. "Survival according to BRAF-V600 Tumor Mutations - An Analysis of 437 Patients with Primary Melanoma." *PLoS ONE* 9(1).
- Menzies, Alexander M, and Georgina V Long. 2012. "Response — Clinicopathologic Features of V600E and V600K Melanoma." *Clin Cancer Res* 20: 1078–0432.
- Michaloglou, C, L C W Vredeveld, W J Mooi, and D S Peeper. 2008. "BRAF(E600) in Benign and Malignant Human Tumours." *Oncogene* 27: 877–95.

- Michaloglou, Chrysiis et al. 2005. "BRAFE600-Associated Senescence-like Cell Cycle Arrest of Human Naevi." *Nature* 436(4): 720–24.
- Mohos A, Sebestyén T, Liskay G, Plótár V, Horváth S, Gaudi I, Ladányi A. 2013. "Immune Cell Profile of Sentinel Lymph Nodes in Patients with Malignant Melanoma - FOXP3+ Cell Density in Cases with Positive Sentinel Node Status Is Associated with Unfavorable Clinical Outcome." *J Transl Med*: 18;11:43.
- Mordoh J. 2009. "Melanoma Cutáneo: Un Campo de Ensayo Para La Inmunoterapia y Un Desafío Médico Skin Melanoma: Test Field for Immunotherapy and a Challenge for Medicine." *Acta Bioquím Clín Latinoam* 43(3): 357–61.
- Mordoh, J., I. Tapia, and M. Barrio. 2013. "A Word of Caution: Do Not Wake Sleeping Dogs; Micrometastases of Melanoma Suddenly Grew after Progesterone Treatment." *BMC cancer* 13: 132. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3607845&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Moreau, Stéphanie et al. 2012. "Prognostic Value of BRAF V600 Mutations in Melanoma Patients After Resection of Metastatic Lymph Nodes." *Annals of Surgical Oncology* (January): 4314–21.
- Morgan et al. 2006. "NIH Public AcceCancer Regression in Patientsa after Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes." *NIH* 127(5796): 126–29.
- Nan, Hongmei, Peter Kraft, David J. Hunter, and Jiali Han. 2009. "Genetic Variants in Pigmentation Genes, Pigmentary Phenotypes, and Risk of Skin Cancer in Caucasians." *International Journal of Cancer* 125(September 2008): 909–17.
- Ostmeier, H, and L Suter. 1989. "The Ki-67 Antigen in Primary Human Melanomas--Its Relationship to Mitotic Rate and Tumor Thickness and Its Stability." *Archives for dermatological research. Archiv fur dermatologische Forschung* 281(3): 173–77.
- Picard, M et al. 2014. "Is BRAF a Prognostic Factor in Stage III Skin Melanoma? A Retrospective Study of 72 Patients after Positive Sentinel Lymph Node Dissection Conflicts of Interest." *British Journal of Dermatology* 171: 108–14.
- Qu, Kevin et al. 2013. "Detection of BRAF V600 Mutations in Metastatic Melanoma: Comparison of the Cobas 4800 and Sanger Sequencing Assays." *Journal of Molecular Diagnostics* 15(6): 790–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.07.003>.
- Quintana, Elsa et al. 2008. "Efficient Tumour Formation by Single Human Melanoma Cells." *Nature* 456(7222): 593–98.
- Quintana et al et al. 2010. "Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients That Is Reversible and Not Hierarchically Organized." *Cancer Cell* 18(5): 510–23.
- Raymond L. Barnhill, Michael W. Piepkorn, Klaus J. Busam (eds.). 2014. 27 The American Journal of Dermatopathology *Pathology of Melanocytic Nevi and Malignant Melanoma*. Springer Berlin Heidelberg.

- RCSB Protein Data Bank (PDB). 2015. "The Complex of Wild Type B-RAF and BAY439006." <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1UWH>.
- Richter, Anna et al. 2013. "A Multisite Blinded Study for the Detection of BRAF Mutations in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Malignant Melanoma." *scientific reports* 3: 1659.
- Robert C. et al. 2011. "Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma." *N Engl J Med*: 364, 2517.
- Robert et al. 2014. "Anti-Programmed-Death-Receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-Refractory advanced melanoma: a randomised dose-Comparison cohort of a phase I trial." *Lancet* 6736:1-9.: 60958-2.
- Rodríguez-peralta, José Luis et al. 2014. "Patología y Recomendaciones Para La Determinación de Biomarcadores En El Melanoma Metastásico." *De, Nacional Espa, Sociedad Anatomía, De Sociedad, De Oncología* 47(1): 9-21.
- Rosenberg, Steven a et al. 2011. "Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy." *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(13): 4550-57.
- Rubinstein, Jill C et al. 2010. "Incidence of the V600K Mutation among Melanoma Patients with BRAF Mutations, and Potential Therapeutic Response to the Specific BRAF Inhibitor PLX4032." *Journal of translational medicine* 8: 67.
- Rutkowski et al. 2014. "Molecular Alterations in Clinical Stage III Cutaneous Melanoma Correlation with Clinicopathological Features and Patient Outcome-2014." *Oncology Letters* 8: 47-54.
- Schatton et al. 2011. "Modulation of T-Cell Activation by Malignant Melanoma Initiating Cells." *Cancer Res* 76(6): 1358-75.
- Schlaak, M. et al. 2013. "Assessment of Clinical Parameters Associated with Mutational Status in Metastatic Malignant Melanoma: A Single-Centre Investigation of 141 Patients." *British Journal of Dermatology* 168: 708-16.
- Schreiber RD, Old L J, Smyth M J. et al. 2011. "Cancer Immuno Editing: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion." *Science*: 331:1565-70.
- Su, Fei et al. 2012. "Mutations in Cutaneous Squamous-Cell Carcinomas in Patients Treated with BRAF Inhibitors." *New England Journal of Medicine*: 207-15.
- Tarhini A et al. 2007. "Durable Complete Responses with High-Dose Bolus Interleukin-2 in Patients with Metastatic Melanoma Who Have Experienced Progression after Biochemotherapy." *J Clin Oncol*: 25, 3802.
- Tschandl, Philipp et al. 2013. "NRAS and BRAF Mutations in Melanoma-Associated Nevi and Uninvolved Nevi." *PLoS ONE* 8(7): 1-8.
- Venesio, Tiziana et al. 2008. "In Melanocytic Lesions the Fraction of BRAF V600E Alleles Is Associated with Sun Exposure but Unrelated to ERK Phosphorylation." *Modern*

*pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21(6): 716–26.

Wan, Paul T C et al. 2004. “Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF.” *Cell* 116(6): 855–67.

Wilson A, Melissa, and Katherine L Nathanson. 2012. “Molecular Testing in Melanoma.” *Cancer J.* 18(2): 117–23.

Wong, Kwong-Kwok. 2009. “Recent Developments in Anti-Cancer Agents Targeting the Ras/Raf/ MEK/ERK Pathway.” *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 4: 28–35.

Yancovitz, Molly et al. 2012. “Intra- and Inter-Tumor Heterogeneity of BRAFV600EMutations in Primary and Metastatic Melanoma.” *PLoS ONE* 7(1): e29336.

Zain et al, Zain A; Michael B; Atkins; Zachary A; Cooper; Michael A; Davies; et. 2015. *BRAF targets in melanoma*. Vol 82. New York.



# ***ANEXOS***

**Anexo 1.** Clasificación actual de la American Joint Committee on Cancer para el MMC (2009)(*Balch et al. 2009*)

| ESTADIO 0   |               |     |   |             |
|-------------|---------------|-----|---|-------------|
| Estadio     |               | TNM |   | Descripción |
| Clínico (a) | Patológico(b) |     |   |             |
| 0           | 0             | Tis | Melanoma in situ  |             |
|             |               | N0  | Sin metástasis regional   |             |
|             |               | M0  | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia                      |             |
| ESTADIO I   |               |     |   |             |
| Estadio     |               | TNM |   | Descripción |
| Clínico (a) | Patológico(b) |     |   |             |
| IA          | IA            | T1a | Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor sin ulceración; mitosis $< 1/mm^2$     |             |
|             |               | N0  | No se detecta metástasis regional   |             |
|             |               | M0  | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia                      |             |
| IB          | IB            | T1b | Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor con ulceración o mitosis $\geq 1/mm^2$ |             |
|             |               | T2a | Melanomas de 1,01–2,0 mm de espesor sin ulceración                        |             |
|             |               | N0  | No se detecta metástasis regional   |             |
|             |               | M0  | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia                      |             |
| ESTADIO II  |               |     |   |             |
| Estadio     |               | TNM |   | Descripción |
| Clínico (a) | Patológico(b) |     |   |             |
| IIA         | IIA           | T2b | Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración                      |             |
|             |               | T3a | Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración                      |             |
|             |               | N0  | No se detecta metástasis regional   |             |
| IIB         | IIB           | M0  | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia                      |             |
|             |               | T3b | Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración                      |             |
|             |               | T4a | Melanomas $> 4,0$ mm de espesor sin ulceración                            |             |
| IIC         | IIC           | N0  | No se detecta metástasis regional   |             |
|             |               | M0  | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia                      |             |
|             |               | T4b | Melanomas $> 4,0$ mm de espesor con ulceración                            |             |
|             |               | N0  | No se detecta metástasis regional   |             |
|             |               | M0  | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia                      |             |

| ESTADIO III |                      |   |
|-------------|----------------------|---|
| Estadio     | TNM                  | Descripción   |
| III         | <b>Clínico (a)</b>   | <p>Cualquier T</p> <p>TX = No se puede evaluar el tumor primario (por ejemplo, melanoma sometido a cirugía o con regresión significativa).</p> <p>T0 = No hay pruebas de tumor primario</p> <p>Tis = Melanoma in situ</p> <p>T1a = Melanomas <math>\leq 1,0</math> mm de espesor sin ulceración; mitosis <math>&lt; 1/mm^2</math></p> <p>T1b = Melanomas <math>\leq 1,0</math> mm de espesor con ulceración o mitosis <math>\geq 1/mm^2</math></p> <p>T2a = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor sin ulceración</p> <p>T2b = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración</p> <p>T3a = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración</p> <p>T3b = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración</p> <p>T4a = Melanomas <math>&gt; 4,0</math> mm de espesor sin ulceración</p> <p>T4b = Melanomas <math>&gt; 4,0</math> mm de espesor con ulceración</p> <p><math>\geq N1</math></p> <p>N1 = metástasis en un ganglio linfático regional</p> <p>N2 = metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales</p> <p>N3 = <math>\geq 4</math> metástasis en los ganglios linfáticos regionales, ganglios amontonados o metástasis en tránsito o lesiones satelitales con ganglio(s) linfático(s) metastásico(s)</p> <p>M0</p> <p>No hay pruebas detectables de metástasis a distancia</p> |
|             | <b>Patológico(b)</b> | <p>III A</p> <p>T1-4a</p> <p>T1a = Melanomas <math>\leq 1,0</math> mm de espesor sin ulceración; mitosis <math>&lt; 1/mm^2</math></p> <p>T1b = Melanomas <math>\leq 1,0</math> mm de espesor con ulceración o mitosis <math>\geq 1/mm^2</math></p> <p>T2a = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor sin ulceración</p> <p>T2b = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración</p> <p>T3a = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración</p> <p>T3b = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración</p> <p>T4a = Melanomas <math>&gt; 4,0</math> mm de espesor sin ulceración</p> <p>N1a</p> <p>Metástasis en un ganglio linfático regional con micrometástasis (c)</p> <p>N2a</p> <p>Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales con micrometástasis (c)</p> <p>M0</p> <p>No hay pruebas detectables de metástasis a distancia</p>   |

| Estadio   | TNM   | Descripción  |
|---|-------|--|
| IIIB  | T1-4b | T1a = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor sin ulceración; mitosis $< 1/mm^2$                                |
|   |       | T1b = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor con ulceración o mitosis $\geq 1/mm^2$                            |
|   |       | T2a = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor sin ulceración   |
|   |       | T2b = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración   |
|   |       | T3a = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración   |
|   |       | T3b = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración   |
|   |       | T4a = Melanomas $> 4,0$ mm de espesor sin ulceración   |
|   |       | T4b = Melanomas $> 4,0$ mm de espesor con ulceración   |
|   |       | N1a Metástasis en un ganglio linfático regional con micrometástasis ( <b>c</b> )                           |
|   |       | N2a Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales con micrometástasis ( <b>c</b> )                    |
| M0 No hay pruebas detectables de metástasis a distancia |       |  |
| IIIB  | T1-4a | T1a = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor sin ulceración; mitosis $< 1/mm^2$                                |
|   |       | T1b = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor con ulceración o mitosis $\geq 1/mm^2$                            |
|   |       | T2a = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor sin ulceración   |
|   |       | T2b = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración   |
|   |       | T3a = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración   |
|   |       | T3b = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración   |
|   |       | T4a = Melanomas $> 4,0$ mm de espesor sin ulceración   |
|   |       | N1b N1b = Metástasis en un ganglio linfático regional con macrometástasis ( <b>d</b> )                     |
|   |       | N2b N2b = Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales con macrometástasis ( <b>d</b> )              |
|   |       | N2c N2c = Metástasis en tránsito, o lesión o lesión(es) satelital(es) sin ganglios linfáticos metastásicos |
| M0 No hay pruebas detectables de metástasis a distancia |       |  |

| Estadio  | TNM  | Descripción   |   |
|--|--|---|---|
| IIIC   | T1-4b  | T1a = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor sin ulceración; mitosis $< 1/mm^2$   |   |
|  |  | T1b = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor con ulceración o mitosis $\geq 1/mm^2$                                     |   |
|  |  | T2a = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor sin ulceración  |   |
|  |  | T2b = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración  |   |
|  |  | T3a = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración  |   |
|  |  | T3b = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración  |   |
|  |  | T4a = Melanomas $> 4,0$ mm de espesor sin ulceración  |   |
|  |  | T4b = Melanomas $> 4,0$ mm de espesor con ulceración  |   |
|  |  | N1b   | N1b = Metástasis en un ganglio linfático regional con macrometástasis ( <b>d</b> )        |
|  |  | N2b   | N2b = Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales con macrometástasis ( <b>d</b> ) |
| N2c  | N2c = Metástasis en tránsito, o lesión(es) satelital(es) sin ganglios linfáticos metastásicos  |   |   |
| M0   | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia   |   |   |
| IIIC   | Cualquier T  | TX = No se puede evaluar el tumor primario (por ejemplo, melanoma sometido a cirugía o con regresión significativa) |   |
|  |  | T0 = No hay pruebas de tumor primario   |   |
|  |  | Tis = Melanoma in situ  |   |
|  |  | T1a = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor sin ulceración; mitosis $< 1/mm^2$   |   |
|  |  | T1b = Melanomas $\leq 1,0$ mm de espesor con ulceración o mitosis $\geq 1/mm^2$                                     |   |
|  |  | T2a = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor sin ulceración.   |   |
|  |  | T2b = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración  |   |
|  |  | T3a = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración  |   |
|  |  | T3b = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración  |   |
|  |  | T4a = Melanomas $> 4,0$ mm de espesor sin ulceración  |   |
| T4b = Melanomas $> 4,0$ mm de espesor con ulceración |  |   |   |
| N3   | Metástasis en $\geq 4$ ganglios linfáticos regionales, ganglios amontonados, o metástasis en tránsito o lesiones satelitales con ganglio(s) linfático(s) metastásico(s). |   |   |
| M0   | No hay pruebas detectables de metástasis a distancia   |   |   |

| ESTADIO IV  |               |             |   |
|-------------|---------------|-------------|---|
| Estadio     |               | TNM         | Descripción   |
| Clínico (a) | Patológico(b) |             |   |
| IV          | IV            | Cualquier T | <p>TX = No se puede evaluar el tumor primario (por ejemplo, melanoma sometido a cirugía o con regresión significativa)</p> <p>T0 = No hay pruebas de tumor primario</p> <p>Tis = Melanoma <i>in situ</i></p> <p>T1a = Melanomas <math>\leq 1,0</math> mm de espesor sin ulceración; mitosis <math>&lt; 1/\text{mm}^2</math></p> <p>T1b = Melanomas <math>\leq 1,0</math> mm de espesor con ulceración o mitosis <math>\geq 1/\text{mm}^2</math></p> <p>T2a = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor sin ulceración</p> <p>T2b = Melanomas de 1,01 a 2,0 mm de espesor con ulceración</p> <p>T3a = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor sin ulceración</p> <p>T3b = Melanomas de 2,01 a 4,0 mm de espesor con ulceración</p> <p>T4a = Melanomas <math>&gt; 4,0</math> mm de espesor sin ulceración</p> <p>T4b = Melanomas <math>&gt; 4,0</math> mm de espesor con ulceración</p> |
|             |               | Cualquier N | <p>NX = No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, extraídos de forma previa por otra razón)</p> <p>N1a = metástasis en un ganglio linfático regional con micrometástasis (c)</p> <p>N1b = metástasis en un ganglio linfático regional con macrometástasis (d)</p> <p>N2a = metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales con micrometástasis (c)</p> <p>N2b = metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales con macrometástasis (d)</p> <p>N2c = Metástasis en tránsito, o lesión(es) satelital(es) sin ganglios linfáticos metastásicos</p> <p>N3 = <math>\geq 4</math> metástasis en los ganglios linfáticos regionales, ganglios amontonados, o metástasis en tránsito o lesiones satelitales con ganglio(s) linfático(s) metastásico(s)</p>   |
|             |               | M1          | <p>M1a = metástasis cutánea, subcutánea o a los ganglios linfáticos distantes y LDH sérica normal</p> <p>M1b = metástasis a los pulmones y LDH sérica normal</p> <p>M1c = metástasis a todos los otros sitios viscerales y LDH sérica normal, o metástasis a distancia a cualquier sitio y LDH sérica elevada</p>   |

T = tumor primario; N = ganglios linfáticos regionales; M = metástasis a distancia.

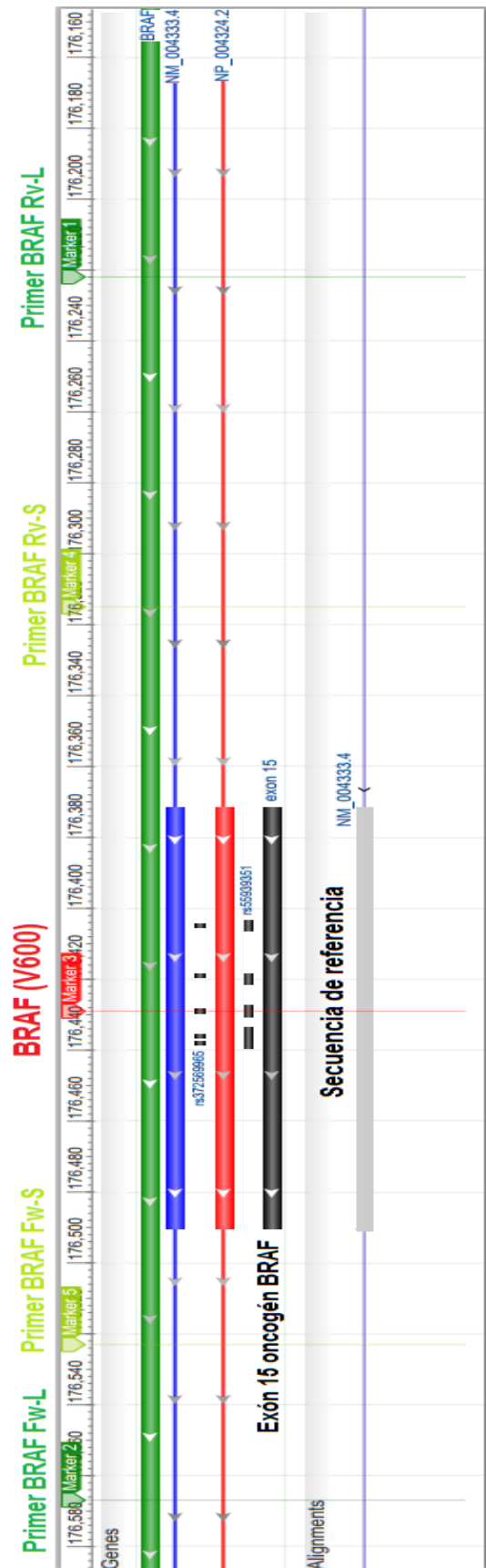
**a**La estadificación clínica comprende la microestadificación del melanoma primario y la evaluación clínica o radiológica de la presencia de metástasis. Según la convención, se debe usar después de la escisión completa del melanoma primario con la evaluación clínica de metástasis regional y a distancia.

**b**El estadio patológico comprende la microestadificación del melanoma primario y la información patológica sobre los ganglios linfáticos regionales después de una linfadenectomía parcial o total. Los pacientes en estadio patológico 0 o IA son la excepción: no necesitan evaluación patológica de los ganglios linfáticos.

**c**Las micrometástasis se diagnostican después de una biopsia de ganglio linfático centinela y una linfadenectomía total (si se realizara).

**d**Las macrometástasis se definen como metástasis ganglionares clínicamente detectables, que se confirman mediante una linfadenectomía terapéutica o cuando la metástasis ganglionar muestra una extensión extra capsular macrocítica.

**Anexo 2.** Mutación del exón 15 del oncogén BRAF en Melanoma cutáneo





**Anexo 3.** Características de las biopsias tumorales de MC incluidos en el presente estudio.

| N° | Código | Tumor               | BRAF(V600)   | SLE  | ST   | Estadio |
|----|--------|---------------------|--------------|------|------|---------|
| 1  | 001H   | MC nodular          | V600E        | 10+  | 10+  | III     |
|    | 002H   | Mts. cutánea        | V600E        |      |      |         |
| 2  | 003H   | Mts ganglionar      | V600E        | 12   | 36+  | III     |
| 3  | 004H   | Mts ganglionar      | V600E        | 3    | 25   | III     |
| 4  | 005H   | MC-primario         | V600E        | 12   | 28+  | III     |
| 5  | 008H   | MC-primario         | V600E        | 2    | 12   | III     |
| 6  | 009H   | Mts cutánea         | <b>WT</b>    | 62+  | 62+  | IIIC    |
|    | 010H   | Mts GL+             | V600E        |      |      |         |
| 7  | 011H   | Mts subcutánea      | V600E        | 25   | 47+  | III     |
| 8  | 012H   | MC nodular          | V600E        | 14+  | 14+  | III     |
| 9  | 013H   | Mts cerebro         | <b>WT</b>    | 17+  | 17+  | III     |
| 10 | 014H   | MC primario         | <b>WT</b>    | 11+  | 11+  | IIC     |
| 11 | 015H   | MC nodular          | V600E        | 72+  | 72+  | III     |
| 12 | 016H   | MC primario         | V600E        | 60+  | 60+  | III     |
| 13 | 017H   | Mts a distancia.    | V600E        | 57+  | 57+  | III     |
| 14 | 018H   | MC nodular          | V600E        | 28+  | 28+  | III     |
| 15 | 019H   | MC primario         | V600E        | 19+  | 19+  | III     |
| 16 | 020H   | MC nodular          | V600E        | 21+  | 21+  | III     |
| 17 | 021H   | MC nodular          | <b>WT</b>    | 22+  | 22+  | III     |
| 18 | 022H   | Mts GL+             | V600E        | 9    | 17   | III     |
| 19 | 023H   | MC nodular          | V600E        | 41+  | 41+  | III     |
| 20 | 024H   | MC nodular          | <b>WT</b>    | 23+  | 23+  | III     |
| 21 | 025H   | MC primario         | <b>WT</b>    | 11+  | 11+  | III     |
|    | 026H   | Mts cutánea         | V600E        |      |      |         |
| 22 | 027H   | Mts cutánea         | V600E        | 2    | 11+  | III     |
| 23 | 028H   | MC nodular          | V600E        | 7    | 14   | III     |
|    | 029H   | MC nodular recibida | V600E        |      |      |         |
|    | 030H   | Mts+ GL+            | V600E        |      |      |         |
|    | 031H   | Mts Cerebro         | V600E        |      |      |         |
| 24 | 032H   | Mts. GL+            | V600E        | 1    | 4    | III     |
| 25 | 033H   | MC. Primario        | V600E        | 4    | 120  | IV      |
| 26 | 034H   | Mts cutánea         | <b>WT</b>    | 36   | 60   | IV      |
| 27 | 035H   | Mts + GL +          | V600E        | 133+ | 133+ | III     |
| 28 | 036H   | Mts + GL            | V600E        | 129+ | 129+ | III     |
| 29 | 037H   | MC. Primario        | V600E        | 117  | 125+ | III     |
| 30 | 038H   | Mts de cerebro      | <b>V600K</b> | 8    | 36+  | IV      |
| 31 | 039H   | Mts de cerebro      | V600E        | 37   | 119  | IV      |
| 32 | 040H   | Mts cutánea         | V600E        | 35   | 82+  | III     |

| N° | Código | Tumor           | BRAF(V600) | SLE  | ST   | Estadio |
|----|--------|-----------------|------------|------|------|---------|
| 34 | 041H   | Mts + GL        | V600E      | 134+ | 134+ | III     |
| 35 | 042H   | Mts cutánea     | <b>WT</b>  | 2    | 76+  | IV      |
| 36 | 043H   | Mts cutánea     | V600E      | 146+ | 146+ | III     |
| 37 | 044H   | MC. Primarios   | V600E      | 84   | 90   | IIC     |
| 38 | 045H   | MC. Primario    | <b>WT</b>  | 25   | 48+  | III     |
| 39 | 046H   | MC. Primario    | V600E      | 127+ | 127+ | IIC     |
| 40 | 047H   | MC nodular      | V600E      | 34   | 47   | IIC     |
| 41 | 048H   | Mts ganglionar  | V600E      | 29   | 45+  | III     |
| 42 | 049H   | Mts. ganglionar | V600E      | 10   | 14   | III     |
| 43 | 050H   | MC primario     | V600E      | 8    | 8    | III     |
|    | 051H   | Mts GL+         | V600E      |      |      |         |
| 44 | 052H   | MC-primario     | <b>WT</b>  | 19   | 39   | III     |

**Anexo 4.** Ejemplo representativo del informe de estudio genético de B-RAF.**INFORME ESTUDIO GENETICO B-RAF**

CIO-FUCA

N. informe: 0029Fecha Informe: 27.10.2014***Datos del paciente***

Apellido y Nombre: 029H

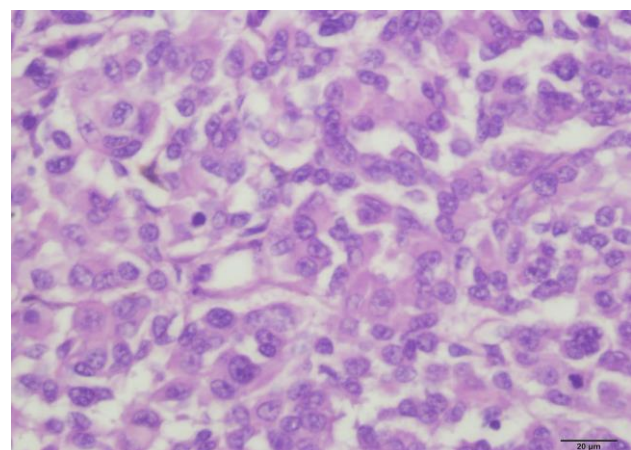
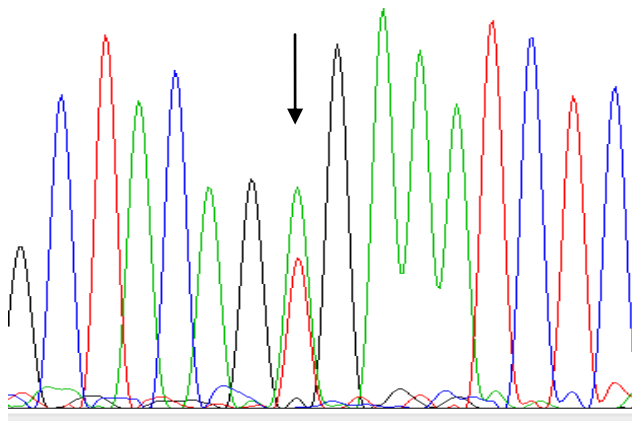
Código paciente: 029H

Muestra: Taco 145608 (GANGLIO LINFATICO)

N. Historia Clínica:

***Resultado del estudio:***B-RAF exón 15: **Mutación V600E.*****Informe final: Secuenciación por método de Sanger***

Se detecta mutación en el exón 15 de B-raf Mutación V600E. Cambio puntual del nucleótido T&gt;A en posición 171429.



Microfotografía de corte histológico correspondiente al taco utilizado para el estudio genético (400X).