

**Bringas, Anahí Lorena**

## **Incidencia de la mutación del gen braf en pacientes con melanoma. Estudio bicéntrico en la ciudad de Córdoba. Argentina.**

---

**Tesis para la obtención del título de posgrado de  
Especialidad en Dermatología**

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



TRABAJO FINAL.

# Incidencia de la mutación del gen braf en pacientes con melanoma. Estudio bicéntrico en la ciudad de Córdoba. Argentina.

Anahi, Bringas<sup>a</sup> (Trabajo para rendir la Especialidad en  
Dermatología).

**Mariana Papa<sup>a</sup>.; Ricardo Campana<sup>a</sup>.; Susana Gomez Zanni<sup>a</sup>.; Susana, Pereyra<sup>b</sup>.;  
Santiago Bella<sup>c</sup>.; Andres Guidi<sup>d</sup>.; Daniel Lerda<sup>e</sup>.**

**a:** Servicio de Dermatología de la Clínica Universitaria Privada Reina Fabiola.

**b:** Servicio de Dermatología del Hospital Córdoba.

**c:** Servicio de Oncología Clínica de la Clínica Universitaria Reina Fabiola

**d:** Servicio de Anatomía Patológica de la Universidad Católica de Córdoba.

**e:** Laboratorio de Genética de la Universidad Católica de Córdoba.

1/07/14

## 1. MARCO TEÓRICO.

El melanoma es un tumor originado en los melanocitos de la piel, las mucosas u otras localizaciones (ojos, sistema nervioso central, mesenterio y oído interno), con alta capacidad metastatizante. Puede surgir tanto de los melanocitos de piel normal como de ciertas lesiones precursoras, como nevos melanocíticos displásicos y congénitos gigantes.

Aunque solo el 4% de todos los canceres de piel son melanoma, éste representa el 80% de las muertes por cáncer cutáneo.

Hasta una quinta parte de los pacientes desarrolla metástasis y las muertes son más tempranas que las de otros tumores sólidos de la economía.

Su incidencia y mortalidad ha aumentado en las últimas décadas, constituyendo uno de los tumores más frecuentes en adultos jóvenes y el tumor maligno con mayor tasa de crecimiento del mundo. La frecuencia es significativamente mayor en poblaciones de raza blanca y muy variable en diferentes partes del mundo.<sup>(1)(2)(7)</sup>

La Sociedad Argentina de Dermatología junto a la Fundación del Cáncer de Piel crearon el Registro Argentino de Melanoma Cutáneo (RAMC), habiéndose detectado desde enero de 2003 a julio de 2013, 6.168 nuevos casos. De los mismos, el 49% fueron mujeres y el 51% hombres con una media de edad de 55,7 años para las mujeres y de 58.5 años para los hombres. Y si bien existen sub registros de datos, se han descripto variaciones de incidencia en sus diversas regiones.<sup>(3)(18)</sup>

El melanoma es una enfermedad de origen multifactorial, en donde los factores de riesgo se pueden subdividir en **ambientales y genéticos**:

1. Factores de **riesgo ambiental**, como exposición excesiva a la radiación ultravioleta, presencia de más de cincuenta nevos melanocíticos benignos, nevos displásicos o atípicos como manifestación del denominado síndrome del nevo displásico, nevos melanocíticos congénitos grandes (más de 20 cm), aumentan el riesgo de padecer melanoma. El melanoma es más frecuente en clases socio culturales altas, relacionado a mayor exposición solar esporádica con fines lúdicos. Otros factores de riesgo incluyen: los fototipos I y II, la altitud y latitud (Índice de radiación ultra violeta) y la inmunosupresión (riesgo triple tras el trasplante de órganos sólidos o en la inmunodeficiencia adquirida)<sup>(1)</sup>
2. Dentro de los **factores genéticos**, se conocen en la actualidad múltiples mutaciones (enfermedad poligénica) que confieren a su portador, mayor riesgo de desarrollar melanoma; influyen tanto alteraciones genéticas heredadas como somáticas, estando implicadas las del control del ciclo celular y las de los mecanismos de control de la transcripción, caracterizándose por un balance defectuoso entre los genes supresores tumorales y los oncogenes. Recientemente fue estudiado el espectro completo de mutaciones somáticas de una célula de melanoma y hallaron 33.345 sustituciones de bases<sup>(4)</sup>.

Existen diferentes perfiles de mutaciones génicas según:

- ✓ sub-tipos clínicos de melanoma,
- ✓ localizaciones anatómicas
- ✓ exposiciones solares y
- ✓ grupos raciales <sup>(5),(6)</sup>.

Continuamente se describen nuevos genes involucrados en la génesis y progresión del melanoma, actualmente se conocen más de 600 relacionados directa o indirectamente,<sup>(19)</sup> pudiéndose describir dos grandes grupos de genes de susceptibilidad al melanoma:

#### **A. Genes de baja prevalencia y alta penetrancia**

Afectan a pocos individuos pero con alta penetrancia, confiriendo **alto riesgo** de melanoma. Se encuentran en *familias* con varios miembros afectados. Entre ellos se encuentra el gen **CDKN2A** (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), que es el gen de mayor susceptibilidad al melanoma, y el **CDK4** (*cyclin-dependent kinase 4*) <sup>(4)(7)</sup>.

#### **B. Genes de alta prevalencia y baja penetrancia**

Afectan a un gran número de personas pero la penetrancia de su mutación es baja. Se encuentran en la población general y en pacientes con melanomas esporádicos y confieren **riesgo bajo o moderado** de padecer la enfermedad. El prototipo es el gen del receptor de la melanocortina 1 o **MCR1** y la Vía MAP kinasas (mitogen activated protein kinase / proteína quinasa activada por mitógenos). <sup>(7)</sup>

El desarrollo de un melanoma sigue una serie de procesos en los que se acumulan diferentes alteraciones genéticas, (enfermedad heterogénea, poli génica) en procesos aún poco claros <sup>(21)(22)</sup>

En el cuadro N°1 se muestran algunas de las mutaciones más frecuentes.

### **CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES GENES INVOLUCRADOS EN LA GÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL MELANOMA.**

#### **Gen, Funciones , Características y Predominancia.**

##### **MCR 1**

Regula la melanogénesis y la proliferación del melanocito  
Gen de alta prevalencia y baja penetrancia.  
Riesgo bajo a moderado para melanoma.  
Posee polimorfismo en el 70% de la población.  
Pelirrojos y rubios.

##### **CDKN2A**

Regula la apoptosis y el ciclo celular  
Actúa a través de la p53 y la proteína del retinoblastoma  
Mayor gen de susceptibilidad al melanoma.  
Baja prevalencia y alta penetrancia.  
Confiere **riesgo alto** para melanoma.  
Melanoma familiar (20-40%).  
Melanoma múltiple.

##### **CDK4**

Oncogén  
Actúa a través de la vía de la proteína del retinoblastoma  
Posee mutaciones somáticas y germinales.  
Confiere **riesgo alto** para melanoma.  
El componente CCND1 está amplificado en el 45% de los melanomas acrales y en mucosos.

##### **RAF**

Actúan por la cascada MAPK  
Activan la proliferación, sobrevivencia e invasión celular.

BRAF: mutado en 20-60% de los melanomas.  
Mutación activada por la RUV.  
Pacientes con:  
· Exposición solar intermitente.  
· Jóvenes.  
· Gran cantidad de nevos.

RAS  
Mutado en 25-50% de los melanomas.  
NRAS: melanomas familiares (95%).

PTEN  
Gen supresor tumoral  
Inhibe cascada PI3K/AKT  
Inhibe la proliferación celular y estimula la apoptosis  
Mutado en 15-45% de los melanomas. Melanomas en estadio avanzado.

TP53  
Principal gen que regula la apoptosis Mutado en 10% de los melanomas.  
Familia Bcl-2 Gen regulador de la apoptosis Posee componentes pro y antiapoptóticos.

MITF  
Regula la supervivencia del melanocito y la melanogénesis  
Mutación activada por la RUV.

Gen c-KIT  
Protooncogén Regula la proliferación y apoptosis celular  
Amplificado en el 20% de los melanomas.  
Mutado y/o amplificado en el 10-39% de los melanomas.  
Melanomas acrales (11%) y mucosos (21%).

### **Vía MAP kinasas: mitogen activated protein kinase**

La vía MAPK es una cascada de señales de transducción, que incluye al NRAS-BRAF - MEK (*mitogen- activated kinases*) y al ERK (*extracellular-related kinases*). Esta cascada comienza con la activación de receptores de membrana tirosin-kinasa (TKR) por varios factores de crecimiento, que activan al RAS. Este a su vez activa a los miembros de la familia RAF, y dispara una fosforilación secuencial y por ende activación de las MEK kinasas y de las ERK kinasas 1 y 2. Las ERK1 y 2 se translocan al núcleo y conducen a la activación de los factores de transcripción de varios genes. <sup>(8)</sup>

La vía MAPK interviene en la proliferación, la supervivencia y la invasión celular y está constitutivamente activada en el melanoma. Las mutaciones de los diferentes componentes de esta vía varían según el subtipo clínico de melanoma. Ver gráfico N°1.

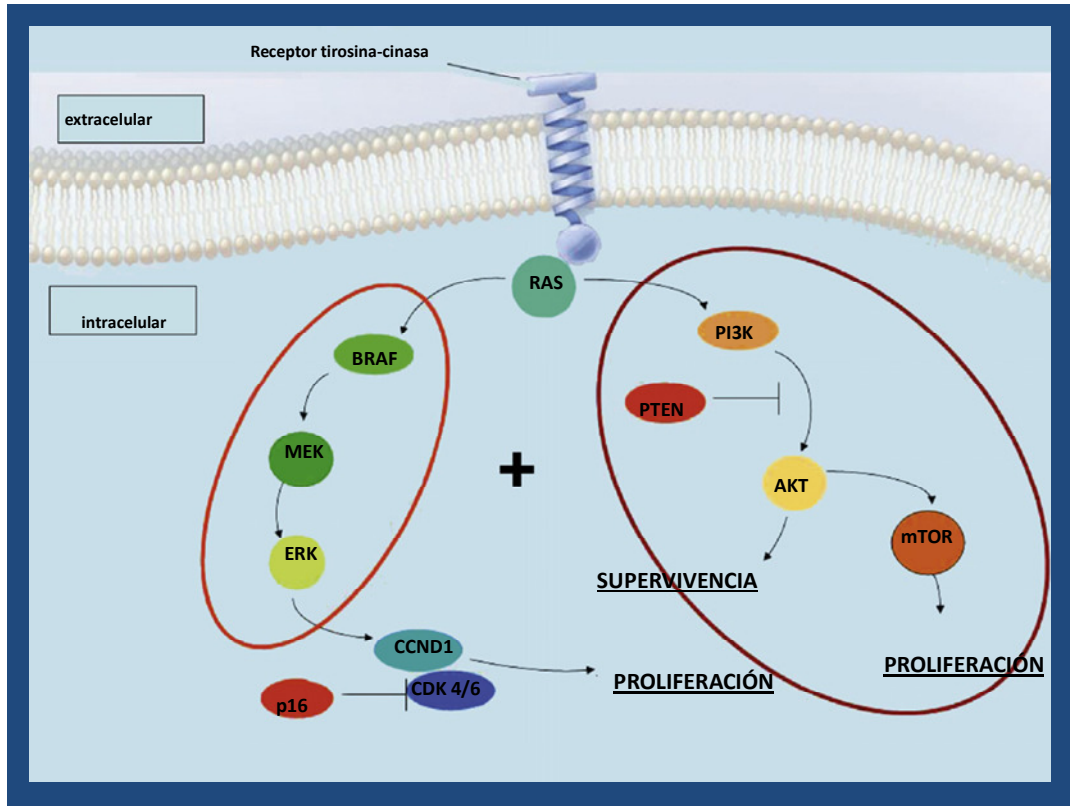


Grafico N° 1 Vías MAP cinasa (MAPK) y fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3K).

### Gen RAF

El RAF es un protooncogen (7q34) que codifica para una proteína perteneciente a la familia de la proteinkinasa serina/treonina, que interviene en la regulación del crecimiento, proliferación y diferenciación celular ante estímulos. La forma salvaje (*wild-type*) es crítica para regular la mitosis celular.<sup>(6)</sup> También promueve la angiogénesis por estimulación autocrina del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Tiene 3 isoformas: A-RAF, B-RAF y C-RAF.

El **BRAF** (homólogo del oncogen del sarcoma viral murino: v-raf) es el más potente activador del MEK y es el oncogen más frecuentemente mutado en cáncer incluyendo al melanoma.

También está mutado hasta en el 82% en los nevus, ya que es un gen de proliferación.

En el año 2002, investigadores del Instituto Sanger descubrieron la mutación más importante en el melanoma, "el gen BRAF", y representa hoy el principal biomarcador genético<sup>(15)(16) (17)(20)(21)</sup>

Estudios muestran una prevalencia de entre 20 y 60% en poblaciones caucásicas, de 25% en un estudio en asiáticos y un reporte Uruguayo mostró una incidencia de 78%.<sup>(9)(7)(18)(20)(29)(33)</sup>

Si bien el mecanismo exacto de acción en el melanoma es desconocido, se sabe que esta mutación sería el paso inicial y necesario para la génesis tumoral, altera la cascada RAS-RAF-MEK Kinasas 1 y 2 ERK kinasas 1 y 2, lo cual estimula la proliferación e invasión celular.<sup>(10)(11)</sup> Su mutación no es por sí

misma suficiente para el desarrollo tumoral y requiere además la presencia de otras mutaciones, como la inactivación de p53. (10)(11)

La frecuencia y tipo de mutación BRAF, podría ser variable según la región geográfica y la etnia, dado que uno de los factores que estimula esta mutación es la radiación ultravioleta. (5)(13)(22)(23) (28)

Los melanomas asociados a mutación del **BRAF** tienen predilección por áreas de *exposición solar intermitente* intensa, en donde la piel no presenta daño solar crónico como tronco y miembros (18)

Existen estudios que demuestran la asociación de esta mutación con la alta exposición a radiaciones ultra violeta ambientales, particularmente en forma intermitente, en pieles claras, no aclimatadas y desde etapas tempranas de la vida (0 a 20 años), mientras que la alta exposición a mayor edad (50 y 60 años) es característica de melanomas con mutaciones **NRAS** (22)

Afectan en mayor medida a pacientes jóvenes (40 años o menos), con gran número de nevos. (18)(20)(22)

En diferentes estudios se intentó demostrar asociación entre sexo y características fenotípicas de los pacientes; en todos ellos se evidenciaron asociaciones no significativas. (22)(24)(30)

Las mutaciones BRAF se encuentran en todos los subtipos de melanoma pero predominan en los melanomas extensivos superficiales y melanomas nodulares en cambio los melanomas mucosos y acrolentiginosos, tienen baja frecuencia de mutaciones de este gen. (5)(18)(22)(30)(32)

No se pudo demostrar si existe asociación de los melanomas braf mutados con diferentes características histopatológicas, ni con el intervalo libre de enfermedad o supervivencia, aunque en algunas series de pocos casos se vio que estos tenían una tendencia a una peor evolución (30)

Las mutaciones de BRAF detectadas en el melanoma, presentan una sustitución de aminoácido en la valina 600. Su mutación somática más frecuente es la **V600E** (80 a 90 %) de las mutaciones, consiste en el cambio de timina por adenina en el nucleótido 1799 y que provoca el cambio del aminoácido valina por un ácido glutámico. Le siguen en frecuencia entre un 5 a 30 % **V600K** (valina por lisina) y 5 % o menos **V600R** (valina por arginina) o **V600D** (valina por ácido aspártico) (25)(26)

A diferencia de la mutación V600E, la incidencia de V600K parece aumentar con la edad (una media aproximada de 10 años mayor), y se asocia también con un mayor grado de daño solar crónico por lo que se infiere que los efectos acumulativos de las radiaciones podrían tener un importante papel en la patogenia (a diferencia de V600E). Por el contrario, el melanoma en el joven, sin daño solar crónico, está fuertemente asociado con el genotipo V600E, lo que implica a la radiación, no un factor asociado, si no un peso específico en el rol etiológico.

Además de ser etiológicamente distintas, la V600E y genotipos V600K muestran comportamientos clínicos diferentes. Los datos sugieren que las mutaciones en BRAFV600K, tendrían mayor relación con los melanomas metastásicos cerebrales y pulmonares y menos tiempo desde el diagnóstico hasta la presentación de las mismas y la muerte con respecto a los melanomas con mutación V600E. (27)(28)

**Detección de mutación.**

Existen múltiples técnicas para la identificación de las mutaciones somáticas subyacentes. En el cuadro N° 2 se resumen las técnicas.

- ✓ La secuenciación de Sanger: es un método fiable para la detección con una sensibilidad de aproximadamente 94% (31)
- ✓ Para la detección del Braf se desarrolló, junto a su nueva terapéutica, un test diagnóstico denominado Cobas® 4800 BRAF V600 Test Mutation. Es una prueba de PCR en tiempo real más sensible en la detección de mutaciones V600E, en más del 5 % de nivel de mutación, que la secuenciación de Sanger (el test de secuenciación de referencia hasta ahora). Fue diseñado específicamente para detectar BRAFV600E, no obstante puede detectar mutaciones V600 como V600D y V600K con menos sensibilidad(28)  
No está a la venta (al menos en nuestro país), está destinado a la selección de pacientes para el tratamiento con vemurafenib.
- ✓ La Piro secuenciación: método que realiza microdissección de las células tumorales. Permite determinar la mutación en las células tumorales sin la interferencia de las células queratinocíticas o dérmicas, una de las más altas sensibilidades como método, pero de baja especificidad.

Cuadro N° 2. Resumen de Técnicas para la determinación de Braf.

Técnicas	Sensibilidad (% de ADN mutado)	Características
Secuenciación directa	25	Requiere mayor cantidad de ADN mutado para su detección
Método de Sanger		Detecta cualquier mutación – Barato
Pirosecuenciación	5 – 10	Requiere equipo especial (pirosecuenciación)- Kit comercial
PCR cuantitativa en tiempo real . cobas *	10	No hay kit comercial – Requiere de Termociclador TR- Solo detecta mutaciones específicas
Scorpions ARMS	1	Kit comercial disponible con las sondas- Requiere de termociclador TR- Solo detecta mutaciones específicas.
Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado PNA-LNA PCR Clamp	1 – 0,1	Se precisan sondas LNA para hacer clamp que no son comerciales. Requiere amplia experiencia en BM. detecta mutaciones específicas
COLD-PCR (CO-amplificación a baja temperatura de desnaturalización)	1 – 0,1	Requiere amplia experiencia en BM. Se puede asociar con técnicas secuenciación y pirosecuenciación
PCR-RFLP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción)	5	Solo detecta mutaciones que generan lugar de restricción
dHPLC (desnaturalización cromatografía líquida de alta resolución)	1	Requiere equipamiento especial y experiencia en HPLC. Detecta cualquier mutación
High-resolution melting (HRM)	1	Detecta cualquier mutación. Precisa Equipamiento específico. Requiere experiencia en BM



## 2. HIPÓTESIS.

Podría el melanoma con mutación del gen BRAF, tener incidencias y expresiones clínico-patológicas particulares en nuestro medio, dadas nuestras particulares características:

- Raciales: la ciudad de Córdoba tras el periodo colonial y tras la segunda mitad de siglo XIX dejó de estar compuesta casi exclusivamente por criollos con orígenes españoles e indígenas para pasar a estar poblada por inmigrantes Europeos. Actualmente la inmensa mayoría (90%) de la población está compuesta por descendientes de italianos y españoles.<sup>(35)(36)</sup>
- Nuestra ubicación en la región central de la Argentina (Latitud 31°21'S Longitud: 64° 05' O Altitud: 410 metros sobre el nivel del mar)

## 3. OBJETIVO.

### Objetivos Generales:

Determinar frecuencia de la mutación del gen BRAF en pacientes con diagnóstico histopatológico de melanoma.

### Objetivos Específicos:

- a) Evaluar las variantes de mutación BRAF.
- b) Establecer asociaciones entre la presencia de la mutación con: la edad del paciente en el momento del diagnóstico, sexo y fototipo; exposición solar y variantes clínico-patológicas, localización y características histológicas.

## 4. DISEÑO.

Estudio descriptivo, retrospectivo.

## 5. PACIENTES Y MÉTODOS.

Este protocolo fue evaluado, aprobado y supervisado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, Universidad Católica de Córdoba (CIEIS Fabiola), e inscripto en el Registro de Investigaciones no patrocinadas del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba. (RePIS),

Recurso económico: El proyecto ganó por concurso un subsidio del Ministerio de ciencia y tecnología de la Provincia de Córdoba, para proyectos de investigaciones clínicas y epidemiológicas orientados en red. No presenta ningún conflicto de interés.

### Criterios de inclusión.

Fueron incluidos en este trabajo, pacientes con

- diagnóstico histopatológico de melanoma de la Clínica Universitaria Reina Fabiola y del Hospital Córdoba (ámbitos de práctica de la carrera de postgrado de Dermatología de la U.C.C.), de la Ciudad de Córdoba, Argentina, obtenidos del registro de datos de ambos servicios de anatomía patológica de dichas instituciones desde el 1° enero 2005 al 1° de enero de 2013.

Criterios de exclusión.

- pacientes que cumplieran con criterios clínicos de melanoma familiar,
- los que presentaron dificultades técnicas en el tratamiento de la muestra (desparafinación del taco biopsia)
- y en la obtención de los datos clínicos-epidemiológicos.

Descripción de procedimientos.

En el laboratorio de genética de la Universidad Católica de Córdoba, se realizó la detección de la mutación del gen BRAF, mediante PCR y secuenciación del producto de amplificación (**Método de Sanger**) de las 50 muestras.

**Extracción del ADN**

Los cortes de tejido fijado en formol e incluidos en parafina, se sometieron a desparafinación en baños sucesivos de xileno y deshidratación con etanol al 100%. Se realizó la digestión proteica y purificación orgánica del ADN extraído, que luego se sometió a amplificación por PCR con oligonucleótidos dirigido a las secuencias de estudio. Los resultados de las pruebas fueron interpretadas después de la electroforesis del producto de la PCR y la revelación del patrón de bandas en gel de poliacrilamida, teñidas con impregnación de plata.

**Detección de mutaciones en el gen BRAF**

Se utilizó el ADN obtenido por amplificación con primers específicos para el exón 15 del gen BRAF frecuentemente mutado. Después de obtener productos de PCR de calidad satisfactoria, los mismos fueron sometidos a la reacción de secuenciamiento en el laboratorio Oncogen utilizando BigDye Terminator ® v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la secuencia determinada sobre ABI PRISM ® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). La confirmación de la identidad de las secuencias que se obtuvo y la identificación de las mutaciones, se realizó a través de la búsqueda en bases de datos específicas, utilizando herramientas de bioinformática apropiadas. Como los ensayos moleculares basadas en PCR dependen de la integridad del ADN, las muestras se sometieron a amplificación de segmentos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb, dos genes tromboxano sintasa (TBXAS): gen activador recombinante humana (RAG1) y gen de la leucemia promielocítica humanos (PLZF) y dos exones del gen AF4 respectivamente, para el control de la viabilidad de los materiales utilizados.

En tabla de excel se adjuntaron los datos clínico epidemiológico (variables) de los pacientes.

Variables a analizar:

- Sexo.
- Edad al momento del diagnóstico.

Los valores de Edad fueron categorizados en 4 grupos:

- ✓ Grupo 1: menores a 30 años
  - ✓ Grupo 2: de 31 á 50 años
  - ✓ Grupo 3: de 51 á 70 años
  - ✓ Grupo 4: mayores a 70 años.
- Fototipo: según Fitzpatrick. Es una escala de 6 puntos basada principalmente en la capacidad cutánea de broncearse o quemarse ante

la exposición solar: fototipo I: se quema fácil y fuertemente y nunca se broncea, fototipo II: se quema fácilmente, se broncea mínimamente y con dificultad, fototipo III: se quema moderadamente, se broncea moderada y uniformemente, fototipo IV: se quema mínimamente, se broncea fácilmente en forma moderada, fototipo V: rara vez se quema, se broncea profusamente (marrón oscuro), fototipo VI: nunca se quema, se broncea profusamente (marrón oscuro o negro) <sup>(1)(34)</sup>

- Exposición solar: la clasificamos en **crónica** e **intermitente**, considerando con exposición crónica a aquellos pacientes que realizaban alguna actividad laboral, deportiva o lúdica que los exponía diariamente a la radiación solar, e intermitente a aquellos que solo lo hacían en días estivales (de vacaciones) en forma esporádica con historia de quemaduras solares graves (eritema intenso con ampollas)<sup>(34)</sup>
- Localizaciones: las agrupamos en:
  - ✓ cabeza y cuello,
  - ✓ tronco,
  - ✓ miembros inferiores
  - ✓ y miembros superiores.
- Variantes clínico-patológicas: comprende:
  - ✓ melanoma lentigo maligno,
  - ✓ melanoma extensivo superficial,
  - ✓ nodular,
  - ✓ mucoso,
  - ✓ acrolentiginoso y
  - ✓ otros para variantes poco frecuentes.
- Características histológicas. ( ver anexo N°1)
  - ✓ nivel de Clarck (clasificado en 5 niveles según infiltración),
  - ✓ el Breslow ,expresado en milímetros y agrupados para su estudio estadístico en 4 grupos:
    - Grupo 1: in situ.
    - Grupo 2: de 0,1 a 0,99 mm
    - Grupo 3: de 1 a 2 mm
    - Grupo 4: de 2 a 4 mm
    - Grupo 5: mayor a 4 mm
  - ✓ si presentaron o no ulceración,
  - ✓ áreas de regresión,
  - ✓ el índice mitótico en: bajo, moderado y alto y
  - ✓ el infiltrado linfocitario asociado al tumor (TIL) en: escaso, moderado e intenso).

Se realizaron análisis descriptivos y análisis de asociación de variables. En el primer caso y a los fines de observar si alguna característica de la variable presentaba valores significativamente mayores Por ejemplo si había

más representantes de un género, se realizaron pruebas chi cuadrado. También se utilizó la prueba de independencia chi cuadrado para probar la asociación entre variables. Cuando correspondía, se realizaron pruebas exactas.

## **6. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.**

Desde el 1° enero 2005 al 1° de enero de 2013 se diagnosticaron 92 casos nuevos de melanomas de los cuales 42 pacientes fueron excluidos del estudio por presentar datos incompletos.

Se estudiaron 50 muestras (36 de la Clínica Reina Fabiola y 14 del Hospital Córdoba). Evaluadas por el mismo dermatólogo en cada una de las instituciones

De ellos, 27 pacientes (54%) fueron del sexo femenino, y 23 (46%) masculinos, la edad media fue de 54,34 años.

El 40% presentó un fototipo III y el 36% un fototipo II.

El 62 % relató haber realizado exposiciones solares intermitentes y el 38 % exposiciones crónicas a las radiaciones ultravioleta.

Las localizaciones de los melanomas primarios fueron de un 36% en el tronco, un 26% en cabeza y cuello, un 22% en miembros inferiores y 16% en miembro superior.

Analizando las características histológicas, los tipo extensivo superficiales fueron significativamente más frecuentes en un 66%, seguidos por el tipo lentigo maligno 12%, nodular 10%, acrolentiginosos 6%, mucosos un 4% y otros el 2 % restante.

El 36% presentaron un clarck 2 y un 30% clarck 1.

En el Breslow se observó mayor frecuencia en el grupo con espesor entre 0.1 y 0,99mm,(44%) seguidos por el grupo con espesor de 1 a 2 mm (36%)

Los índices mitóticos de dichas muestras fueron principalmente bajo 40% y moderado 34 % y el TIL fue intenso y moderado 34% y 32% respectivamente. De todos ellos el 79,17% no presentó ulceración y el 85,42% no evidenció signos de regresión en el estudio anatomopatológico.

En 8 muestras (16%) se evidencio asociación a nevo.

En la tabla N°1 se resume la caracterización de la muestra.

TABLA N°1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA. (n:50)

SEXO		Frecuencia	Porcentaje %	
	<b>FEMENINO</b>	<b>27</b>	<b>54%</b>	
	MASCULINO	23	46%	
EDAD				
	<30 años	6	12%	
	30 a 50 años	15	30%	
	<b>50 a 70 años</b>	<b>20</b>	<b>40%</b>	
	>70 años	9	18%	
FOTOTIPO				
	I	7	14%	
	II	18	36%	
	<b>III</b>	<b>20</b>	<b>40%</b>	
	IV	5	10%	
	V	0	0%	
	VI	0	0%	
EXP. SOLAR				
	<b>INTERMITENTE</b>	<b>31</b>	<b>62%</b>	
	CRÓNICO	19	38%	
LOCALIZACIÓN				
	CABEZA Y CUELLO	13	26%	
	M.INFERIORES	11	22%	
	M. SUPERIORES	8	16%	
	<b>TRONCO</b>	<b>18</b>	<b>36%</b>	
VARIANTES CLÍNICO-PATOLÓGICAS				
	<b>EXTENSIVO SUPERFICIAL</b>	<b>33</b>	<b>66%</b>	
	LENTIGO MALIGNO	6	12%	
	NODULAR	5	10%	
	ACROLENTIGINOSOS	3	6%	
	MUCOSOS	2	4%	
	EPITELOIDE	1	2%	
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS				
	CLARCK	I	15	30%
		<b>II</b>	<b>18</b>	<b>36%</b>
		III	13	26%
		IV	4	8%
	BRESLOW			
		IN SITU	6	12%
		0,1 a 0,99mm	22	44%
		<b>1 a 2mm</b>	<b>18</b>	<b>36%</b>
		<b>2 a 4mm</b>	<b>2</b>	<b>4%</b>
		> 4mm	2	4%
	ULCERACIÓN			
		<b>NO</b>	<b>40</b>	<b>80,00%</b>
		SI	10	20,00%
	AREAS DE REGRECIÓN			
		<b>NO</b>	<b>43</b>	<b>86,00%</b>
		SI	7	14,00%
	INDICE MITÓTICO			
		<b>BAJO</b>	<b>20</b>	<b>40%</b>
		MODERADO	17	34%
		ALTO	13	26%
	TIL			
		<b>ESCASO</b>	<b>17</b>	<b>34%</b>
		MODERADO	16	32%
		<b>INTENSO</b>	<b>17</b>	<b>34%</b>
	ASOCIACIÓN A NEVO			
		SI	8	16%
		<b>NO</b>	<b>42</b>	<b>84%</b>

De los 50 pacientes estudiados, solo 8 presentaron la mutación.

La frecuencia de mutación BRAF fue de 16% (8 de 50 pacientes). Y el 84% (42 de 50) presentaron un BRAF nativo ó salvaje (*wild-type*)

Se presenta en la tabla 2. Los casos con mutación son significativamente menores. (Chi=23.12; p<0,001).

MUTACION	Frecuencia (n)	Porcentaje %
BRAF +	8	16,0%
BRAF WT	42	84,0%
Total	50	100%

Tabla 2. Distribución frecuencia de mutación Braf.  
W.T: wild type.

Si relacionamos el grupo que presentó la mutación Braf (n: 8) con las variables en estudio, el 50% (n:4) tenía entre 50 y 70 años, seguido por el rango de 30 a 50 años con un 25%(n:2) y un 12, 5% para los extremos de la vida. (Chi= 0,48; p=0,923). Tablas 3.

EDAD	MUTADO	WT	Total
<30 años	1	5	6
30 a 50 años	2	13	15
50 a 70 años	4	16	20
> 70 años	1	8	9
Total	n:8	n:42	n:50

Tabla 3a Frecuencias absolutas de la relación entre edad y mutación (si/no)

EDAD	MUTADO
<30 años	12,50%
30 a 50 años	25,00%
50 a 70 años	50,00%
>70años	12,50%
Total	100,00%

Tabla 3b. Frecuencias relativas, n: 8 (100%)

- Sexo. Sin asociaciones significativas pero podemos describir que en nuestro trabajo el 75% (n: 6) de las mutaciones se presento en pacientes de sexo femenino. Y que en asociaciones relativas permaneció este predominio.

SEXO	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
FEM.	6	21	27
MASC.	2	21	23
Total	n:8	n:42	n:50

Tabla 4a Frecuencias absolutas de la relación entre sexo y mutación

SEXO	MUTADO%
FEM.	75%
MASC.	25%
Total	100,00%

Tabla 4b Frecuencias relativas n: 8 (100%)

SEXO	MUTADO%	WT%	Total %
------	---------	-----	---------

FEM.	22,23%	77,77%	100,00%
MASC.	8,67%	91,33%	100,00%
Total	16,00%	84,00%	100,00%

Tabla 4c Frecuencias relativas por fila

- De los 8 pacientes que presentaron mutación, 4(50%), presentaban fototipo III; 2(25%) fototipo II y los otros 2 (25%) fototipo I. Si analizamos los subgrupos de cada fototipo, las frecuencias relativas muestran que el 28,57% del grupo con fototipos I presentaron la mutación, el 20% con fototipos III, el 11.11% de los fototipos II. Los fototipos IV, V y VI no presentaron mutación. No se observe una asociación entre la fototipo y mutación (Chi= 2,33; p=0,506). Tablas 5.

FOTOTIPO	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
I	2	5	7
II	2	16	18
III	4	16	20
IV	0	5	5
V	0	0	0
VI	0	0	0
Total	n: 8	n: 42	n: 50

Tabla 5a Frecuencias absolutas de la relación entre fototipo y mutación

FOTOTIPO	MUTADO%
I	25,00%
II	25,00%
III	50,00%
IV	0,00%
V	0,00%
VI	0,00%
Total	100,00%

Tabla 5b Frecuencias relativas por columnas n:8 (100%)

FOTOTIPO	MUTADO%	BRAF WT%	Total%
I	28,57%	71,43%	100,00%
II	11,11%	88,89%	100,00%
III	20,00%	80,00%	100,00%
IV	0,00%	100,00%	100,00%
V	0,00%	0,00%	100,00%
VI	0,00%	0,00%	100,00%
Total	16,00%	84,00%	100,00%

Tabla 5c Frecuencias relativas por filas

- Con respecto a la exposición solar 7 de los 8 (87,50%) pacientes con mutación Braf refirió exposición solar intermitente. (Chi= 2,63; p=0,105). Tablas 6.

EXPO SOLAR	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
Crónica	1	18	19
Intermitente	7	24	31
Total	n:8	n:42	n:50

Tabla 6a Frecuencias absolutas de la relación entre exposición solar y mutación

EXPO SOLAR	MUTADO%
Crónica	12,50%
Intermitente	87,50%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 6b Frecuencias relativas n: 8 (100%)

EXPO SOLAR	MUTADO%	WT%	Total %
Crónico	5,26%	94,74%	100,00%
Intermitente	22,58%	77,42%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16,00%</b>	<b>84,00%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 6c Frecuencias relativas por fila

- Según la localización, de los 8 pacientes, 3 (37,5%) se presentaron el tumor en el tronco, otros 3 (37,5%) en los miembros inferiores y 2 (25%) restante a nivel de cabeza y cuello.

Ninguno de los melanomas con mutación se localizó en miembros superiores.

Observando cada subgrupo el 27.7% de los localizados en miembros inferiores fueron BRAF positivos, el 16,67% de los de tronco y el 15,38 de los localizados en cabeza y cuello. No se observa una asociación significativa entre localización y mutación (Chi= 2,57; p=0,462). Tablas 7.

LOCALIZACION	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
Cab y cuello	2	11	13
M. inferior	3	8	11
M. sup	0	8	8
Tronco	3	15	18
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 7a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y mutación

LOCALIZACIÓN	MUTADO%
Cab. y cuello	25,00%
M inferior	37,50%
M sup.	0,00%
Tronco	37,50%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 7b Frecuencias relativas n: 8 (100%)

LOCALIZACIÓN	MUTADO%	WT%	Total%
Cab. y cuello	15,38%	84,62%	100,00%
M inferior	27,27%	72,73%	100,00%
M sup.	0,00%	100,00%	100,00%
Tronco	16,67%	83,33%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16,00 %</b>	<b>84,00%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 7c Frecuencias relativas por filas

- De 8 casos mutados, 5 (62,5%) eran melanomas tipo extensivo superficiales, 1 (12,5%) tipo lentigo maligno, en iguales porcentajes a este ultimo los de tipo nodular y acrolentiginoso. En el tipo mucosos y otras variedades poco comunes como fue el tipo epiteloideas en nuestro trabajo no se observó mutación. Si observamos el total de la n de cada subgrupo de tipos histológicos encontramos mutado el 33,33% de los



acrolentiginosos, el 20% de los nodulares, el 16,67% de los lentigos malignos y el 15,15% de los extensivos superficiales. No se observó asociación significativa ( $\chi^2 = 1,32$ ;  $p = 0,933$ ). Tablas 8.

TIPO HISTO	MUTADO (n)	WT(n)	Total(n)
Ext.sup	5	28	33
Lentigo m,	1	5	6
Nodular	1	4	5
Acrolentiginos	1	2	3
Mucoso	0	2	2
Epiteloide	0	1	1
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 8a Frecuencias absolutas de la relación entre variantes clínico-patológicas y mutación

TIPO HISTO	MUTADO %
Ext.sup	62,50%
Lentigo m.	12,50%
Nodular	12,50%
Acrolentiginos	12,50%
Mucoso	0,00%
Epiteloide	0,00%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 8b Frecuencias relativas, n: 8 (100%)

TIPO HISTO	MUTADO%	WT %	Total
Ext.sup	15,15%	84,85%	100,00%
Lentigo m	16,67%	83,33%	100,00%
Nodular	20,00%	80,00%	100,00%
Acrolentiginos	33,33%	66,67%	100,00%
Mucoso	0,00%	100,00%	100,00%
Epiteloide	0,00%	100,00%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16,00%</b>	<b>84,00%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 8c Frecuencias relativas por filas

- Con respecto al Breslow, en donde tampoco se observó asociación significativa con la mutación ( $\chi^2 = 3,40$ ;  $p = 0,334$ ). Tablas 9. Podemos observar que el 62,5% (N: 5) de los mutados, presentaron un espesor entre 1 y 2 mm, el 25% (N: 2) 0,1 y 0,99 mm y el 12,5% (N: 1) in situ. No se observó mutación en espesores superiores a 2mm. El análisis por subgrupo también muestra mayor incidencia en espesores entre 1 a 2 mm.

BRESLOW	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
In situ	1	5	6
0,1 a 0.99mm	2	20	22
1 a 2mm	5	13	18
2 a 4mm	0	2	2
>4mm	0	2	2
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 9a Frecuencias absolutas de la relación entre Breslow y mutación.

BRESLOW	MUTADO%
---------	---------

In Situ	12,50%
0,1 a 0,99mm	25,00%
1 a 2mm	62,50%
2 a 4mm	0,00%
>4mm	0,00%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 9b Frecuencias relativas. N: 8 (100%)

BRESLOW(mm)	MUTADO%	WT%	Total%
In Situ	16,67%	83,33%	100,00%
0,1 a 0,99	9,09%	90,91%	100,00%
1 a 2	27,78%	72,22%	100,00%
2 a 4	0,00%	100,00%	100,00%
>4	0,00%	100,00%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16,00%</b>	<b>84,00%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 9c Frecuencias relativas por filas

- Del 100 % de los Braf positivos el 50% (n:4) tenían un Clark 3, el 37,50% (n:3) Clark 1 y el 12,5%(n:1) Clark 2. En las frecuencias relativas de cada subgrupo no muestra diferencias No observándose una asociación entre Clark y mutación (Chi= 4,51; p=0,211). Tablas 10.

CLARK	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
1	3	12	15
2	1	17	18
3	4	9	13
4	0	4	4
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 10a Frecuencias absolutas de la relación entre Clark y mutación.

CLARK	MUTADO%
1	37,50%
2	12,50%
3	50,00%
4	0,00%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 10b Frecuencias relativas n: 8 (100%)

CLARK	MUTADO%	WT%	Total%
1	20,00%	80,00%	100,00%
2	5,56%	94,44%	100,00%
3	30,77%	69,23%	100,00%
4	0,00%	100,00%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16,00%</b>	<b>84,00%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 10c Frecuencias relativas por filas.

- Dentro de las variables histopatológicas el 75% (N: 6) no presentaron ulceración, pero analizando cada uno de los subgrupos, el 20% de los ulcerados presento mutación contra un 15% de los no ulcerados. No se observa una asociación entre ulceración y mutación (Chi=0,10; p=0,750). Tablas 11.

ULCERACION	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
No	6	34	40
Si	2	8	10
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 11a Frecuencias absolutas de la relación entre ulceración y mutación.

ULCERACION	MUTADO%
No	75,00%
Si	25,00%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 11b Frecuencias relativas n: 8 (100%)

ULCERACION	MUTADO%	WT%	Total
No	15%	85%	100,00%
Si	20%	80%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16%</b>	<b>84%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 11c Frecuencias relativas por filas.

- De los 8 pacientes con BRAF positivo 7 (87,50%) no presentaban áreas de regresión en las muestras. En estudios de cada subgrupo, entre los que no presentaron área de regresión solo el 16,27% presentó la mutación y el 14,29% de los que si tenían áreas regresivas. (Chi= 0,03; p=0,855). Tablas 12.

Áreas Reg..	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
No	7	36	43
Si	1	6	7
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 12a Frecuencias absolutas de la relación entre áreas de regresión y mutación.

Áreas Reg.	MUTADO%
No	87,50%
Si	12,50%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 12b Frecuencias relativas, n: 8 (100%)

Áreas Reg.	MUTADO%	WT%	Total%
No	16,27%	83,73%	100,00%
Si	14,29%	85,71%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16%</b>	<b>84%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 12c Frecuencias relativas por filas.

- Con respecto al índice mitótico el 50% (n:4) presentó un índice mitótico moderado, un 25% (n:2) bajo y el otro 25% alto índice mitótico. Observando por subgrupos del total de casos con índice mitótico moderado el 23,53% presentó mutación contra el 76,47% que fue tipo salvaje. (Chi= 1,26; p=0,534) no significativa. Tablas 13.

IND.MIT	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
Bajo	2	18	20
Moderado	4	13	17
Alto	2	11	13
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 13a Frecuencias absolutas de la relación entre índice mitótico y tipo de mutación.

IND.MIT	MUTADO%
Bajo	25,00%
Moderado	50,00%
Alto	25,00%
Total	100,00%

Tabla 13b Frecuencias relativas n:8 (100%)

IND.MIT	MUTADO%	WT%	Total%
Bajo	10,00%	90,00%	100,00%
Moderado	23,53%	76,47%	100,00%
Alto	15,38%	84,62%	100,00%
Total	16,00%	84,00%	100,00%

Tabla 13c Frecuencias relativas por filas.

- Cuatro de ocho pacientes en sus estudios anatomopatológicos evidenció un TIL moderado (50%). Dos (25%) presentaron un TIL intenso y otros 2 (25%) TIL escaso. No se observa una asociación significativa entre TIL y mutación (Chi= 7,57; p=0,055). Tablas 14.

TIL	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
Escaso	2	15	17
Moderado	4	12	16
Intenso	2	15	17
Total	8	42	50

Tabla 14a Frecuencias absolutas de la relación entre TIL y tipo de mutación.

TIL	MUTADO%
Escaso	25,00%
Moderado	50,00%
Intenso	25,00%
Total	100,00%

Tabla 14b Frecuencias relativas n: 8 (100%)

TIL	MUTADO%	WT%	Total%
Escaso	11,76 %	88,23%	100,00%
Moderado	25,00%	75,00%	100,00%
Intenso	11,76%	88,24%	100,00%
Total	16,00%	84,00%	100,00%

Tabla 14c Frecuencias relativas por filas entre TIL y tipo de mutación.

- El 75% (6 de 8) de los melanomas con mutación Braf no se asocio a la presencia de nevo previo, pero de las 8 melanomas asociados a nevo, incluidos en el trabajo, 2 presentaron la mutación (25 %) del grupo. No se observa una asociación (Chi= 0,57; p=0,449). Tablas 15.

NOVO/NEVO	MUTADO(n)	WT(n)	Total(n)
Nevos disp	2	6	8
No	6	36	42
Total	8	42	50

Tabla 15a Frecuencias absolutas de la relación entre presencia de Nevo y tipo de mutación.

NOVO/NEVO	MUTADO%
Nevos disp	25,00%
No	75,00%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 15b Frecuencias relativas n: 8 (100%)

NOVO/NEVO	MUTADO%	WT%	Total%
Nevos disp	25,00%	75,00%	100,00%
No	14,29%	85,71%	100,00%
<b>Total</b>	<b>16,00%</b>	<b>84,00%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 15c Frecuencias relativas por filas

### Tipo de Mutación.

La frecuencia de tipo de mutación se presenta en las tablas 16.

Si uno observa entre las mutaciones activadoras del BRAF (n: 8), el porcentaje de la mutación V600E es del 62,5%, aunque esta diferencia es notable, no resulta significativa (Chi=3,25; p=0,1969).

Es importante recalcar que en nuestro trabajo se observaron 2 de las 8 mutaciones (25%) en V600M y un caso de mutación V600L (12,5%)

MUTACION	Frecuencia	Porcentaje
V600E	5	10
V600L	1	2
V600M	2	4
WT	42	84
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

Tabla 16a. Distribución de mutación mutación.

MUTACION	Frecuencia	Porcentaje
V600E	5	62,5
V600L	1	12,5
V600M	2	25,0
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

Tabla 16b Distribución del tipo

### Relaciones entre variables.

- Edad con el tipo de mutación BRAF. No se observa una asociación (Chi= 9,60; p=0,383). Tablas 17.

EDAD(años)	V600E(n)	V600L(n)	V600M(n)	WT(n)	Total(n)
<30	0	1	0	5	6
30 a 50	1	0	1	13	15
50 a 70	3	0	1	16	20
> 70	1	0	0	8	9
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 17a Frecuencias absolutas de la relación entre edad y tipo de mutación.

EDAD(años)	V600E %	V600L%	V600M%	WT%	Total%
<30	0,00 %	100,00%	0,00%	11,90%	12,00%
30 a 50	20,00%	0,00%	50,00%	30,95%	30,00%
50 a 70	60,00%	0,00%	50,00%	38,10%	40,00%
>70	20,00%	0,00%	0,00%	19,05%	18,00%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>

Tabla 17b Frecuencias relativas por columnas. n: 8

- SEXO y tipo de mutación, sin resultados significativos podemos describir que el 60% de las mutaciones en V600E fueron en sexo femenino, así como la única mutación en V600L y los dos casos de V600M.

SEXO	V600E(n)	V600L(n)	V600M(n)	WT(n)	Total(n)
FEM.	3	1	2	21	27
MASC.	2	0	0	21	23
Total	5	1	2	42	50

Tabla 18a Frecuencias absolutas de la relación entre sexo y tipo de mutación

SEXO	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total%
FEM.	11,12	3,70	7,41	77,77	100,00
MASC.,	8,70	0,00	0,00	91,30	100,00
Total	10,00	2,00	4,00	84,00	100,00

Tabla 18b Frecuencias relativas por filas n: 8

SEXO	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total%
FEM.	60,00	100,00	100,00	50,00	54,00
MASC.	40,00	0,00	0,00	50,00	46,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabla 18c Frecuencias relativas por columnas. n: 8

- Fototipo y tipo de mutación. No se observa una asociación (Chi= 5,78; p=0,762). Tablas 19.

FOTOTIPO	V600E	V600L	V600M	WT	Total
I	2	0	0	5	7
II	1	0	1	16	18
III	2	1	1	16	20
IV	0	0	0	5	5
V	0	0	0	0	0
VI	0	0	0	0	0
Total	5	1	2	42	50

Tabla 19a Frecuencias absolutas de la relación entre fototipo y tipo de mutación.

FOTOTIPO	V600E %	V600L %	V600M %	WT%	Total%
I	40,00%	0,00%	0,00%	11,90%	14,00%
II	20,00%	0,00%	50,00%	38,10%	36,00%
III	40,00%	100,00%	50,00%	38,10%	40,00%
IV	0,00%	0,00%	0,00%	11,90%	10,00%
Total	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 19b Frecuencias relativas por columnas. n:8

- Exposición solar y tipo de mutación. Si bien no se observa una asociación significativa entre la exposición solar y algún tipo de mutación, de las V600E el 80% de los pacientes realizó exposiciones solares intermitentes. (Chi= 2,95; p=0,399). Tablas 20.

EXPO SOLAR	V600E(n)	V600L(n)	V600M(n)	WT(n)	Total(n)
Cronico	1	0	0	18	19
Interm	4	1	2	24	31

Total	5	1	2	42	50
Tabla 20a Frecuencias absolutas de la relación entre fototipo y tipo de mutación					
EXPO SOLAR	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total%
Crónico	5,26	0,00	0,00	94,74	100,00
Interm	12,90	3,23	6,45	77,42	100,00
Total	10,00	2,00	4,00	84,00	100,00

Tabla 20b Frecuencias relativas por filas n: 8

EXPO SOLAR	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total%
Cronico	20,00	0,00	0,00	42,86	38,00
Interm	80,00	100,00	100,00	57,14	62,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabla 20c Frecuencias relativas por columnas. n: 8

- Localización vs tipo de mutación. No se observa una asociación entre la localización y tipo de mutación (Chi= 10,49; p=0,312). Tablas 21. Aunque podemos describir que V600E se localizó con mayor frecuencia en tronco y cabeza y cuello, y que el 100% (n: 2) se encontró en melanomas de miembros inferiores.

LOCALIZ.	V600E(n)	V600L(n)	V600M(n)	WT(n)	Total(n)
Cab y cuello	2	0	0	11	13
M inferior	1	0	2	8	11
M sup.	0	0	0	8	8
Tronco	2	1	0	15	18
Total	5	1	2	42	50

Tabla 21a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y tipo de mutación.

LOCALIZ.	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total%
cab y cuello	15,38	0,00	0,00	84,62	100,00
M inferior	9,09	0,00	18,18	72,73	100,00
M sup.	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
Tronco	11,11	5,56	0,00	83,33	100,00
Total	10,00	2,00	4,00	84,00	100,00

Tabla 21b Frecuencias relativas por filas n:8

LOCALIZ.	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total%
Cab y cuello	40,00	0,00	0,00	26,19	26,00
M inferior	20,00	0,00	100,00	19,05	22,00
M sup	0,00	0,00	0,00	19,05	16,00
Tronco	40,00	100,00	0,00	35,71	36,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabla 21c Frecuencias relativas por columnas. n: 8

- Variantes clínico patológicas y tipo de mutación. No se observa una asociación entre tipo histológico y tipo de mutación (Chi= 9,21; p=0,866). Tablas 22.

TIPO HISTO	V600E(n)	V600L(n)	V600M(n)	WT(n)	Total(n)
Ext.sup	3	1	1	28	33
Lentigo m	1	0	0	5	6
Nodular	1	0	0	4	5
Acrolentiginos	0	0	1	2	3
Mucoso	0	0	0	2	2
Epiteloides	0	0	0	1	1

Total 5 1 2 42 50

Tabla 22a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y tipo de mutación

TIPO HISTO	V600E%	V600L%	V600M%	WT %	Total %
Ext.sup	9,09	3,03	3,03	84,85	100,00
Lentigo m	16,67	0,00	0,00	83,33	100,00
Nodular	20,00	0,00	0,00	80,00	100,00
Acrolentiginos	0,00	0,00	33,33	66,67	100,00
Mucoso	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
Epiteloide	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
Total	10,00	2,00	4,00	84,00	100,00

Tabla 22b Frecuencias relativas por filas. n: 8

TIPO HISTO	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total %
Ext.sup	60,00	100,00	50,00	66,67	66,00
Lentigo m	20,00	0,00	0,00	11,90	12,00
Nodular	20,00	0,00	0,00	9,52	10,00
Acrolentiginos	0,00	0,00	50,00	4,76	6,00
Mucoso	0,00	0,00	0,00	4,76	4,00
Epiteloide	0,00	0,00	0,00	2,38	2,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabla 22c Frecuencias relativas por columnas. n: 8

- Breslow y tipo de mutación. Sin asociación significativa entre Breslow y tipos de mutación (Chi= 9,72; p=0,374). Tablas 23.

BRESLOW	V600E(n)	V600L(n)	V600M(n)	WT(n)	Total(n)
In Situ	0	0	1	5	6
0,1 a 0,99mm	1	1	0	20	22
1 a 2 mm	4	0	1	13	18
2 a 4 mm	0	0	0	2	2
>4 mm	0	0	0	2	2
Total	5	1	2	42	50

Tabla 23a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y tipo de mutation

BRESLOW	V600E%	V600L%	V600M%	WT%	Total %
In Situ	0,00	0,00	50,00	11,91	12,00
0,1 a 0,99mm	20,00	100,00	0,00	47,62	44,00
1 a 2 mm	80,00	0,00	50,00	31,95	36,00
2 a 4 mm	0,00	0,00	0,00	4,76	4,00
>4 mm	0,00	0,00	0,00	4,76	4,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabla 23b Frecuencias relativas. N:8

- Clark y tipo de mutación. No se observa una asociación entre Clark y tipo de mutación (Chi= 15,14; p=0,087). Tablas 24.

CLARK	V600E	V600L	V600M	WT	Total
1	1	0	2	12	15
2	0	1	0	17	18
3	4	0	0	9	13
4	0	0	0	4	4
Total	5	1	2	42	50

Tabla 24a Frecuencias absolutas de la relación entre Clark y mutación



CLARK	V600E	V600L	V600M	WT	Total
1	20,00	0,00	100,00	28,57	30,00
2	0,00	100,00	0,00	40,48	36,00
3	80,00	0,00	0,00	21,43	26,00
4	0,00	0,00	0,00	9,52	8,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Tabla 24b Frecuencias relativas por columnas

- Ulceración y tipo de mutación. Sin asociación significativa entre ulceración y tipo de mutación (Chi= 1,31; p=0,726). Tablas 25. Podemos describir que el 80% de las mutaciones V600E no presento ulceración.

ULCERACION	V600E	V600L	V600M	WT	Total
no	4	1	1	32	38
si	1	0	1	8	10
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>40</b>	<b>48</b>

Tabla 25a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y tipo de mutación

ULCERACION	V600E	V600L	V600M	WT	Total
no	80,00	100,00	50,00	80,00	79,17
si	20,00	0,00	50,00	20,00	20,83
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Tabla 25b Frecuencias relativas por columnas

- Áreas Regresión y tipo de mutación. No se observa una asociación entre áreas regresión y tipo de mutación (Chi= 7,06; p=0,0701). Tablas 26. De todas las variantes el único caso de V600L presentaba áreas de regresión.

areas regre	V600E	V600L	V600M	WT	Total
no	5	0	2	34	41
si	0	1	0	6	7
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>40</b>	<b>48</b>

Tabla 26a Frecuencias absolutas de la relación entre areas regres y tipo de mutación

areas regre	V600E	V600L	V600M	WT	Total
no	100,00	0,00	100,00	85,00	85,42
si	0,00	100,00	0,00	15,00	14,58
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Tabla 26b Frecuencias relativas por columnas

- Índice Mitótico y tipo de mutación. No se observa una asociación entre Índice mitótico y tipo de mutación (Chi= 5,79; p=0,447). En V600E el 60% (n: 3) presenta un índice mitótico moderado y un 40%(n: 2) un alto índice. La única mutación V600L presento bajo índice y de V600M 1 de bajo y 1 de moderado índice mitótico. Tablas 27.

IND. MIT	V600E	V600L	V600M	WT	Total
Bajo	0	1	1	18	20
Moderado	3	0	1	13	17
Alto	2	0	0	11	13

Total	5	1	2	42	50
Tabla 27a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y tipo de mutación					
IND. MIT	V600E	V600L	V600M	WT	Total
Bajo	0,00	100,00	50,00	42,86	40,00
Moderado	60,00	0,00	50,00	30,95	34,00
Alto	40,00	0,00	0,00	26,19	26,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Tabla 27b Frecuencias relativas por columnas

- TIL y tipo de mutación. V600E presento un 40% (n: 2) TIL moderado e igual porcentaje TIL intenso. El único caso de V600L presento un TIL moderado y en V600M un caso presento TIL bajo y uno moderado. No se observa asociación entre TIL y mutación (Chi= 14,31; p=0,112).

Tablas 28

TIL	V600E	V600L	V600M	WT	Total
Bajo	1	0	1	15	17
Moderado	2	1	1	12	16
Intenso	2	0	0	15	17
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 28a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y tipo de mutación

TIL	V600E	V600L	V600M	WT	Total
Bajo	20,00	0,00	50,00	35,72	34,00
Moderado	40,00	100,00	50,00	28,57	32,00
Intenso	40,00	0,00	0,00	35,71	34,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Tabla 28b Frecuencias relativas por columnas

- Nevo y tipo de mutación. No se observa una asociación entre novo/nevo y tipo de mutación (Chi= 8,01; p=0,086). Tablas 29. Pero podemos mencionar que V600E sus 5 casos (100%) no presento asociación a nevo, el único caso de V600L estaba asociado (100%) y V600M uno de los casos(50%) estaba asociado y el otro no (50%)

NOVO/NEVO	V600E	V600L	V600M	WT	Total
Nevos	0	1	1	6	8
No	5	0	1	36	42
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>42</b>	<b>50</b>

Tabla 29a Frecuencias absolutas de la relación entre localización y tipo de mutación

NOVO/NEVO	V600E	V600L	V600M	WT	Total
Nevos	0,00	100,00	50,00	14,29	16,00
No	100,00	0,00	50,00	85,71	84,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Tabla 29b Frecuencias relativas por columnas

## 7. Discusión

Se conocen en la actualidad múltiples mutaciones genéticas que confieren a su portador mayor riesgo de desarrollar melanoma, esto indica que es una

enfermedad heterogénea, con diferentes sub poblaciones celulares en procesos aún poco claros.

El BRAF es el oncogén más frecuentemente mutado en melanoma. Si bien su mecanismo de acción es desconocido, se sabe que sería el paso inicial y necesario para la génesis tumoral.

Uno de los factores que estimula las mutaciones del BRAF es la radiación ultravioleta, y esta es variable según localizaciones regionales dependientes de la altitud y latitud, y sus efectos sobre la piel son diferentes según el fenotipo de las personas, siendo bien conocido el mayor daño en personas con fototipos bajos y a su vez estos tiene diferentes prevalencias en diferentes razas.

Este trabajo es desarrollado en una región central de la República Argentina, donde no se conocen datos previos tanto a nivel regional como nacional.

Cabe destacar que las diferencias en este estudio han sido estadísticamente no significativas, posiblemente debido al pequeño número muestral y que al ser retrospectivo dificulto cierta recolección de datos, por ejemplo, los ligados a el tipo de exposición solar, se hizo difícil poder establecer el tipo de daño solar y es por eso que se los clasifico según los datos incluidos en las historias clínicas. No pudiendo determinar si existieron exposiciones intensas en los primeros años de vida.

Lo diversos estudios publicados llevados a cabo en poblaciones caucásicas han presentado una prevalencia entre 20 a 60% de mutación BRAF y un estudio en asiáticos una prevalencia del 25%.

No se encuentran publicaciones de poblaciones latinoamericanas, solo encontramos un reporte de población Uruguay donde se detecto la mutación BRAF en 27 de 28 muestras mediante técnica de piro secuenciación (método con mayor sensibilidad a los usadas en el resto de publicaciones)<sup>(31)</sup>

La frecuencia de mutación BRAF en nuestro trabajo fue de 16% (8 de 50 pacientes).

Dentro de los trabajos publicados (todas poblaciones caucásicas), en donde estudiaron específicamente la frecuencia de mutación con método de Sanger, podemos destacar. **Pollock y col** (2003) informó de mutaciones BRAF en cuatro de cinco muestras (80%), y **Cruz y col**, 2003 encontraron la mutación BRAF en dos de diez melanomas primarios (20%). **Dong y col**, 2003 encontró mutaciones BRAF en cinco de ocho (63 %) en melanomas en fase de crecimiento vertical y dos de 20 (10 %) de los melanomas en fase de crecimiento radial. **Maldonado y col** (2003) incorpora 115 pacientes en donde 32 presentaron la mutación (28%) y 13 (25%) de 52 pacientes que estudiaron **Lang y MacKie**(2005)

Las publicaciones más recientes utilizaron para el desarrollo de la detección, en su gran mayoría, el método cobas<sup>o</sup> e incluyeron tanto tumores primarios como tumores metastásicos en donde la frecuencia de la mutación BRAf resulta ser mayor <sup>(38)(39)(43)</sup>

El método utilizado para la detección (Secuenciación de Sanger) es un método confiable y según **Michaela , Fassunke y col.**, quienes realizaron un trabajo de comparación entre los métodos más conocidos para la detección de mutaciones BRAF, se comparó la secuenciación de sanger, secuenciación específica de última generación (NGS), Pirosecuenciación (TheraScreen<sup>o</sup> o

Braf Pyrokit Quiagen<sup>o</sup>), Alelo específico PCR( Cobas<sup>o</sup>), fusión de alta resolución(HRM) con técnicas de inmunohistoquímica; determinando que el método de Sanger es fiable y que estos métodos presentan diferentes sensibilidades y especificidades, pero sin que exista un consenso sobre que método es el más confiable.

De los trabajos publicados no se observa una uniformidad en los métodos utilizados para la detección, siendo otro de los motivos que nos imposibilita la comparación de datos.

Nuestra frecuencia, algo inferior a las publicadas, consideramos podría deberse a un tamaño muestral pequeño, a la inclusión de melanomas finos y la sensibilidad del método de detección. Consideramos sería de utilidad aumentar el número de pacientes y nuevos testeos con métodos de mayor sensibilidad a modo comparativo.

Si relacionamos el grupo que presentó la mutación Braf con las variables en estudio este se presentó más frecuentemente, 50% (4 de 8 pacientes) en el rango etario de entre 50 y 70 años, seguido por el rango de 30 a 50 años en un 25%, algo superior a las publicaciones que describen pacientes jóvenes de 40 años o menos (18)(20)(22)

Con respecto a la exposición solar 7 de los 8 pacientes (85,50%) referían exposición solar intermitente coincidiendo con las certezas de que esta mutación está ligada a este tipo de exposiciones.(18)(24)(40)(41)(42)

En diferentes estudios se intentó demostrar asociación con sexo y características fenotípicas de los pacientes, en todos ellos se evidenciaron asociaciones no significativas.(22)(24)(30)(40)(41) y nuestro trabajo ha coincidido en presentar ciertas asociaciones que tampoco fueron significativas .

Podemos describir en nuestro estudio que el 75% (n: 6) de las mutaciones se presentó en pacientes de sexo femenino. Y que del grupo con Braf mutado, 4 de ellos (50%) eran fototipo III, 2 (25%) fototipo II y los otros 2 fototipo I. Si analizamos por subgrupo, las frecuencias relativas muestran que el 28,57% del grupo de los fototipos I presentaron la mutación, convirtiéndose en el más frecuente.

Con respecto a la localización el 37,5% de los mutados (3 de 8) se presentaron en el tronco, y en iguales porcentajes (37,5%) en los miembros inferiores y el 25% restante a nivel de cabeza y cuello y ninguno de los melanomas con mutación se localizó en los miembros superiores. Y observando los porcentajes según las N de cada grupo el 27.7% de los localizados en miembros inferiores fueron BRAF positivos, el 16,67% de los de tronco y el 15,38 de los localizados en cabeza y cuello. No se observa una asociación significativa, pero son coincidentes a las dadas a conocer en diferentes trabajos, con excepción del alto porcentaje de la mutación a nivel de cabeza y cuello, creemos estaría acorde a la limitación de del pequeño número de pacientes.(30)(40)(41)(43)

Las mutaciones BRAF se encuentran en todos los subtipos de melanoma, pero predominan en los melanomas extensivos superficiales y melanomas

nodulares.<sup>(28)(30)(41)(43)</sup> En nuestro trabajo, 5 de 8 (62,5%) casos mutados fueron de tipo extensivos superficiales, 1 de 8 (12,5%) tipo lentigo maligno y en iguales porcentajes a este último los de tipo nodular y acrolentiginoso. No existiendo mutaciones en los grupos de los mucosos y otras variedades poco comunes como fue el tipo epiteloides en nuestro trabajo. Siendo coincidente con la bibliografía, salvo un alto porcentaje en la variante acrolentiginoso pero probablemente debida a un reducido tamaño muestral.

En numerosos estudios se intentó asociar esta mutación a alguna característica histopatológica que pudiera marcar el pronóstico del melanoma, no pudiéndose demostrar asociación alguna, al igual que nosotros <sup>(30)(40)(43)</sup>

Con respecto al Breslow, en donde tampoco se observó asociación significativa pudimos observar que 5 de los 8 pacientes con mutación BRAF el 62,5% midió entre 1 y 2 mm de profundidad, 2 de 8 (25%) entre 0,1 y 0,99 mm y 1 de 8 (12,5%) in situ y ninguno de los mutados presentó en Breslow superiores a 2mm.

El 75% (6 de 8) no presentaron ulceración, pero de 8 pacientes con BRAF positivo, 7 (87,5%) presentaban áreas de regresión en las muestras. El 50% tenían un Clark 3.

El 75% de las mutaciones no se relacionó a nevo previo (6 de 8) pero de las 8 melanomas asociados a nevo, incluidos en el trabajo, 2 presentaron la mutación es decir el 25 % del grupo. No se observa una asociación

Con respecto al índice mitótico el 50% presentó un índice mitótico moderado, un 25% bajo el otro 25% presentó un alto índice mitótico.

Cuatro de ocho pacientes (50%) evidenciaba un TIL moderado y los otros dos 25% fueron para los grupos con TIL intenso y TIL bajo.

Las mutaciones de BRAF más prevalentes detectadas en el melanoma son la V600E (80 a 90 %) de las mutaciones y le siguen en frecuencia entre un 5 a 30 % V600K y 5 % o menos V600R o V600D.<sup>(25)(26)</sup>. En nuestro trabajo hemos encontrado la particularidad de que porcentaje de V600E entre los mutados es del 62,5%, algo inferior a su predominio marcado entre las mutaciones.

Lo interesante es no haber observado mutaciones V600K y la presencia de 2 de las 8 mutaciones (25%) en V600M comprendiendo el 4% del total y un caso de mutación V600L (12,5%) que han sido descripta en pocos reportes en asociación a melanoma. Creemos que estas diferencias se deberían al método utilizado para su detección como así también al tamaño muestral.

## **8. CONCLUSIONES**

Estudiamos 50 muestras mediante método de Sanger para la detección de la mutación BRAF.

La incidencia de mutaciones de BRAF en melanomas cutáneos con fines predictivos alcanza un 16% de los pacientes estudiados.

Si bien ninguna diferencia fue estadísticamente significativa, entre los pacientes con mutaciones en Braf se presentó una edad media de 50 años, un fototipo III y un 75% fueron mujeres.

El 88% refirió exposiciones solares intermitentes.

El 75% se localizó en tronco y miembros inferiores y predominaron los de tipo melanoma extensivo superficial (62%) seguido por melanoma lentigo maligno y nodular.

Histologicamente describimos que el 62% presento un Breslow entre 1 y 2mm de espesor, el 75% no presentó ulceración, el 87% no evidencio áreas de. El índice mitótico en un 50% fue moderado al igual que la infiltración linfocitaria.

Dentro de las variables de mutación, el 62,5% fue tipo V600E. No observamos mutaciones V600K, el 25% variante V600M y un 12,5% V600L.

## **9. CONSIDERACIONES ÉTICAS.**

Los integrantes del equipo de investigación salvaguardaran todos los aspectos éticos, legales y jurídicos contenidos en las normas bioéticas Nacionales- disposición ANMAT 5330/97 e Internacionales- Código de Nuremberg, declaración de Helsinki y sus modificaciones, Declaración Universal Sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por Conferencia General de la UNESCO del 1 de noviembre de 1997.

A si mismo este protocolo fue evaluado y aprobado con recomendación en el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud de la Clínica Universitaria Privada reina Fabiola, (CIEIS Fabiola) en su sesión del día 21 de junio de 2011. (VER ANEXOS)

Ya realizadas las modificaciones recomendadas en este trabajo. Ver 2 del 4 de abril de 2012.

**Confidencialidad:** Los investigadores salvaguardaran la confidencialidad de la identidad de los pacientes y de la información médica que de ellos obtenga a partir de este estudio.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Bologna J., Jorizzo J., Rapini R., Dermatologia, ed Elsevier. 2008 Vol 2 cap 114 pag 1789-1813.
2. Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. Clin Dermatol 2009; 27:46-52
3. Loria D. Registro Argentino de Melanoma. Sociedad Argentina de Dermatología. Fundación cáncer de piel. 2012
4. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. Nature 2010; 463:191-196.

5. Saldanha G, Potter L, Daforno P, Pringle JH. Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4499-4505.
6. Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:64-71.
7. Gonzalez V. Genes de predisposición al melanoma. *Melanoma familiar Dermatol. Argent.*, 2010; 5:327-336.
8. Hendrickson AW, Meng XW, Kaufmann SH. Anticancer therapy: boosting the bang of Bim. *J Clin Invest* 2008; 118:3582-3584.
9. Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y. *et ál.* Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *Int J Oncol* 2009; 34:1481-1489.
10. Yu H, McDaid R, Lee J. *et ál.* The role of BRAF mutation and p55 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *Am J Pathol* 2009; 174:2367-2377.
11. Gill M, Tok Celebi J. B-RAF and melanocytic neoplasia. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53:108-114.
12. Smalley KS, Xiao M, Villanueva, Nguyen TK *et ál.* CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *J Oncogene* 2009; 28:85-94.
13. Hocker T, Tsao H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 2007; 28:578-588.
14. Jiveskog S, Ragnarsson-Olding B. *et al.* N-Ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. *J Invest Dermatol* 2007;111:757-761.
15. Chin L., Levi A. Garraway, and David E. Fisher. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *genesdev.cshlp.org* on October 20, 2010;2149-2189
16. Botella-Estrada R. and Sanmartín Jiménez O. New Therapies Targeting the Genetic Mutations Responsible for Different Types of Melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2010; 101(5):394-400
17. Frank G., Hensin T., Helen W., *et al.* Genetic Alterations in Signaling Pathways in Melanoma. *Clin Cancer Res* 2006; 2301s 12(7 Suppl) April 1, 2006.

18. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T., et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2135-2147.
19. Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2575-2595.
20. Davis H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2007; 445:851-7.
21. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt E., *Cell* 141,583-594, may 14, 2010. Elsevier Inc. Philadelphia PA 19104 USA.
22. Thomas N., Edmiston S., Audrey A., et al. Number of Nevi and Early-Life Ambient UV Exposure Are Associated with BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(5). May 2007
23. Ascierto PA, Kirkwood, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM et al. The role of V600 mutation in melanoma. *J transl Med* 2012;10:85.
24. Edlundh Rose E, Egyha Zi S, Omholt K, et al. Nras and Braf mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 2006;16:471-8
25. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med*. 2010 Jul 14;8:67. doi:10.1186/1479-5876-8-67.
26. Lovly CM, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PlosOne*. 2012;7(4):e35309. doi:10.1371/journal.pone.0035309. Epub 2012 Apr 20.
27. *McArthur G., Chapman P., Robert C., et al.* Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *TheLancet.com/oncology* Vol 15 March 2014:323-332
28. Menzies A., Haydu L, Visintin L, et al. Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600E and V600K BRAF-Mutant Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res* 2012; 18:3242-3249. Published OnlineFirst April 24, 2012.
29. Chang DZ, Panageas KS, Osman L, et al: Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma *J Transl Med* 2:e46, 2004



30. Long G, Menzies A, Nagrial A, et al. Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic *BRAF* in Metastatic Melanoma. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY. VOLUME 29 NUMBER 10 APRIL 1 2011 -1239-46
31. Ihle M, Fassunke J, King C, et. al. Comparación de análisis de alta resolución de fusión, pirosecuenciación, secuenciación de próxima generación y inmunohistoquímica para secuenciación de Sanger convencional para la detección de p.V600E y no p.V600E mutaciones de BRAF , Vol. 14 No. 1 Página: 13 BMC Cancer 2014,14:1-13
32. Lang J and MacKie R. Prevalence of Exon 15 BRAF Mutations in Primary Melanoma of the Superficial Spreading, Nodular, Acral, and Lentigo Maligna Subtypes. J Invest Dermatol 125:575 –579, 2005
33. Mazzei M.,y col. Determinación de la mutation BRAF V600E en melanomas de pacientes uruguayos. Rev. Med.Urug 2013;29(2):97-102.
34. Pathak M. et al. Acute and chronic effects of the sun. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB (eds )Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 5<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill, 1999, p 1598. [ [Links](#) ]
- 35-[World statesmen.org: Argentina.](#)» (en inglés) (web). worldstatesmen.org. (2007). Consultado el 13 de octubre de 2008.
- 36-«[CIA - The world factbook: Argentina.](#)» (en inglés) (web). cia.gov. (2008)
37. Ugurel S, et al., B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. PLoS One., 2007. 2(2): 212-236.
38. Houben R, et al., Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. J Carcinog, 2004. 3(1): 2-6.
39. Dong J, et al., BRAF Oncogenic Mutations Correlate with Progression rather than Initiation of Human Melanoma. Cancer Research, 2003. 63(14): 3883-3885.
40. Liu W, et al., Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF (T1799A (V600E)) mutation in primary melanoma. J Invest Dermatol, 2007. 127(4): 900-905.
41. Hacker E, et al., The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: Findings from an Australian population. J Invest Dermatol, 2010. 130:241-248.

42. Thomas NE, et al., RAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* 2006. 16(2): 97-103.

43. TR Stjepanovic. Factore pronóstico del estado mutacional de braf en pacientes afectos de melanoma metastásico.  
[ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2013/hdl\\_2072.../TR-Stjepanovic.pdf](http://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2013/hdl_2072.../TR-Stjepanovic.pdf)

## **ANEXO N° 1**

Nivel de invasión de Clark. Describe la profundidad que el tumor primario ha penetrado en los niveles de la piel. Tipo Clark está clasificado como I a V

Nivel I. Los melanocitos malignos se encuentran confinados a la epidermis (melanoma in situ).

Nivel II. Se observa una infiltración parcial de la dermis papilar por melanocitos aislados o agrupados en pequeños nidos.

Nivel III. Las células tumorales llenan y expanden la dermis papilar, con extensión del tumor a la zona de interfase entre la dermis papilar y la reticular..

Nivel IV. Las células del melanoma infiltran la dermis reticular de forma significativa.

Nivel V. Las células del melanoma infiltran el tejido celular subcutáneo

Mayor grosor: Espesor tumoral de **Breslow**. Es una medición cuantitativa del grado de invasión del tumor de la dermis que debe realizarse con un ocular con micrómetro calibrado. Mide el espesor, expresado en milímetros, desde la capa más superficial de la capa granulosa, en perpendicular desde la superficie epidérmica, hasta el punto más profundo de invasión de la masa tumoral en la dermis.

Ulceración: sólo se considera cuando existe una pérdida del espesor total de la epidermis.

Índice mitótico (número de mitosis por mm<sup>2</sup>). El método recomendado para la medición del índice mitótico es el siguiente: la sección completa se evalúa para determinar el área dérmica del tumor en el que parece haber una mayor cantidad de mitosis. El número de mitosis se cuenta en un área de 1 mm<sup>2</sup> (aproximadamente 5 campos de gran aumento en un microscopio a 400 ×). El recuento de mitosis se comienza en el área donde se ha observado que hay un mayor número de mitosis y se determina contándolas en campos sucesivos (según las recomendaciones del «1982 International Pathology Workshop»

- Menos del 1 por milímetro cuadrado (escaso)
- 1 a 4 por milímetro cuadrado (moderado)
- Más de 4 por milímetro cuadrado (alto)

Regresión histológica tumoral. La regresión se caracteriza por la ausencia de células de melanoma en una región focal de la fase de crecimiento radial adyacente a la fase de crecimiento vertical, a menudo flanqueado por uno o

ambos lados por el tumor. La epidermis se suele encontrar adelgazada fundamentalmente por una desestructuración del patrón de crestas epidérmicas. En la dermis subyacente se observa un ensanchamiento de la dermis papilar con un aumento de las fibras de colágeno paralelo a la superficie de la epidermis (fibroplasia no laminada), junto con un infiltrado linfocitario difuso poco intenso, la presencia de melanófagos en la dermis papilar y un grado de edema variable. Se encuentran telangiectasias que típicamente adquieren una orientación perpendicular a la epidermis. Este parámetro histológico parece tener especial relevancia, pues empeora el pronóstico en los tumores de espesor delgado.

Infiltrado inflamatorio. El infiltrado linfocitario asociado al tumor (tumor infiltrating lymphocytes [TIL], de la literatura anglosajona: los linfocitos que infiltran el tumor) se clasifica como **intenso** si existe un infiltrado difuso de linfocitos que acapara toda la fase de crecimiento vertical del tumor, ó si se encuentran linfocitos que infiltran al menos un 90 % de la circunferencia de la base tumoral. Se define como **no intenso o moderado** si el infiltrado es focal, y **escaso** cuando no hay linfocitos entremezclados con las células tumorales, incluso aunque se puedan observar de forma perivascular dentro o fuera de la masa tumoral.