

(1)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SERVICIO DE DERMATOLOGIA, HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS MUTACIONES EN B-RAF V600E, N-RAS, C-KIT EN
PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON MELANOMA EN EL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL
HOSPITAL GENERAL "DR MANUEL GEA GONZÁLEZ" DESDE 2006-2012

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN:
DERMATOLOGIA

PRESENTA:
PRISCILLA DENISE ZEPEDA LÓPEZ

TUTORES:
DRA. SONIA TOUSSAINT CAIRE
DRA. DANIELA GUTIÉRREZ MENDOZA

JULIO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

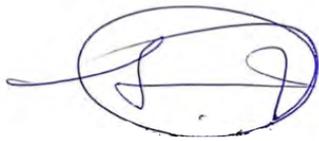
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

(2)

Este trabajo fue realizado en la Secretaría de Salud, Hospital General Dr. Manuel Gea González; División de Dermatología: Secciones de Dermatología Clínica, y Dermatopatología; En colaboración con el departamento de patología y de investigación del Instituto Nacional De Cancerología de México por la Dra. Priscilla Denise Zepeda López con la dirección y supervisión de la Dra Sonia Toussaint Caire y la Dra. Daniela Gutiérrez Mendoza

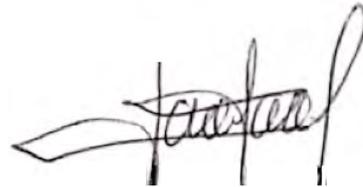
(3)

Este trabajo de Tesis con No. PROT. 06-57-2012 presentado por el alumno Priscilla Denise Zepeda López se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la tesis Dra. Sonia Toussaint Caire , y la División de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha del para su impresión final.



Dirección de enseñanza e Investigación

Dr. Octavio Sierra Martínez



Tutor principal

Dra. Sonia Toussaint Caire

(4)

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez

Dirección de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”



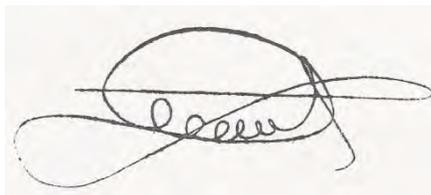
Dra. María Elisa Vega Memije

Subdirección de Investigación Biomédica
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”



Dr. Luciano Domínguez Soto

Jefatura de la División de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

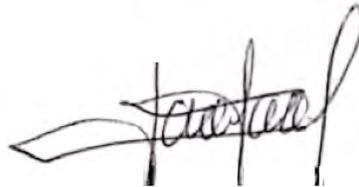


(5)

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS MUTACIONES EN B-RAF V600E, N-RAS, C-KIT EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON MELANOMA EN EL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL "DR MANUEL GEA GONZÁLEZ" DESDE 2006-2012

Colaboradores:

Dra Sonia Toussaint Caire

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sonia Toussaint Caire', with a stylized flourish extending to the left.

Dra Daniela Gutiérrez Mendoza

(6)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ponerme en el sitio y tiempo correctos, y por guiarme paso a paso a través de este largo y difícil camino, gracias por cada uno de los días buenos y malos, porque gracias a esos días puedo disfrutar al máximo esta victoria.

A mi madre, por ser la piedra angular en la cual me he apoyado para construir mi sueño, porque sé que cada una de mis angustias y alegrías las ha vivido como si fueran suyas, y sobre todo por cuidar y proteger a mi gran tesoro mientras yo lograba esta meta.

A mis hijas Aimée y Tití, mil gracias por su amor incondicional, a pesar de las ausencias siempre me esperan con los brazos abiertos, dispuestas a compartirme una sonrisa y un *te quiero mami*. Porque sin lugar a dudas ustedes son la razón de mi esfuerzo, el porqué día a día me levanto y lucho, esperando que se sientan orgullosas de mí. Mis niñas, ustedes son lo más maravilloso que tengo en la vida, y agradezco a Dios cada día por tenerlas a mi lado... LAS AMO

A mi hermano Gogoño por brindarme siempre un consuelo, por ser mi mejor amigo y confidente, a mi padre por sus enseñanzas que aunque duras, al paso de los años me han resultado de suma utilidad y que desde donde quiera que esté se sienta orgulloso de lo que he logrado, así como al resto de mi familia por su enorme motivación

(7)

Al Dr Eduardo David Poletti Vázquez, por haber inculcado en mí el amor a esta profesión, por impulsarme a ser cada día mejor médico, por darme la confianza para vencer mis miedos y hacer de mí una triunfadora

A la Dra. Ma. Teresa de Jesús Vega González por ser un ejemplo a seguir como profesionalista, como madre y como mujer, gracias por su apoyo

A la Dra Sonia Toussaint Caire por su enseñanza y dedicación a este protocolo, al Dr Héctor Martínez Said, Al Dr Saúl Lino Silva, Dr Julio Salas y Dr Gregorio Alcázar por creer en este proyecto

A Patty, Jis, Alejilla, Adri, Karen y Tamar porque más que mis compañeras y amigas, han sido mis cómplices en esta aventura, y ahora forman parte de mi familia

A todos mis maestros y a esta institución por permitirme salir airoso de este reto

INDICE

Glosario	10
Relación de figuras y tablas.....	11
Resumen	12
Abstract.....	13
1. Introducción	14
2. Antecedentes	19
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	23
5.1. Objetivo General	23
5.2. Objetivos Particulares	23
6. Material y Métodos	24
6.1. Tipo de estudio.....	24
6.2. Ubicación temporal y espacial.....	24
6.3. Criterios de selección de la muestra.....	24
6.4. Variables.....	25
6.5. Tamaño de la muestra.....	26
6.6. Procedimiento.....	26
6.7. Análisis estadístico.....	28

7. Resultados	28
8. Discusión	38
9. Conclusiones	42
10. Perspectivas	43
11. Bibliografía	44
12. Anexos	48
12.1. Anexo No. 1.....	48
12.2. Anexo No. 2.....	49
12.3 Anexo No. 3.....	50
12.4 Anexo No. 4.....	51

GLOSARIO

Breslow: sistema de medición utilizado para reflejar el crecimiento vertical de un tumor, se expresa en milímetros

Clark: sistema de medición utilizado para establecer invasión tumoral a nivel de la epidermis, dermis, hasta llegar al tejido celular subcutáneo

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

C-KIT: receptor transmembranal de tirosin-cinasa involucrado en vías de señalización necesarias para la diferenciación celular incluidos los melanocitos

B-RAF: gen involucrado en la vía de señalización encargada de la homeostasis celular

N-RAS: gen involucrado en la activación de vías de señalización involucradas en homeostasis celular

CDKN2A: cinasa dependiente de ciclina encargada de síntesis de proteínas esenciales en el adecuado funcionamiento del ciclo celular

CD117: anticuerpo monoclonal utilizado para evidenciar mutaciones en C-KIT

LMM: lentigo maligno melanoma

MES: melanoma de extensión superficial

Acral iv: melanoma acral invasor

CPM: cáncer de piel melanoma

ABCDE: sistema nemotécnico para el criterio diagnóstico de los melanomas :

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Cuadro 1. Ejemplificación del ABCDE para el diagnóstico de melanoma

Cuadro 2. Niveles de Clark

Cuadro 3. Principales vías moleculares implicadas en la génesis del melanoma

Figura 1. Frecuencia del melanoma en relación al género

Figura 2. Distribución por edad

Figura 3. Lugar de procedencia de pacientes con diagnóstico de melanoma

Figura 4. Tiempo de evolución promedio en años con melanoma

Figura 5. Frecuencia de subtipos histológicos

Figura 6. Relación de mutaciones según el subtipo histológico de melanoma

Figura 7. Secuencia normal del gen B-RAF V600E

Figura 8. Secuencia mutada del gen B-RAF V600E

Figura 9. Melanoma negativo para C-KIT

Figura 10. Patrón citoplásmico C-KIT positivo

Figura 11. Predominio de positividad C-KIT central

Figura 12. Patrón positivo a nivel de unión dermoepidérmica para C-KIT

Figura 13. Patrón de positividad para C-KIT que refleja invasión tumoral

Tabla 1. Tabla general de resultados

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El cáncer de piel constituye el segundo lugar de todas las neoplasias en México, y de este, el melanoma ocupa el tercer lugar seguido del carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide, y melanoma con menos del 9%. Según estadísticas del Registro Nacional de neoplasias, el melanoma tiene una prevalencia de 1 por cada 100,000 habitantes en nuestro país, con un aumento en los últimos 20 años del 500%. Si bien el melanoma no constituye un problema de salud pública, continúa siendo el tumor con una mortalidad superior al 80%. Entre los factores de riesgo para el desarrollo de este tumor sobresalen los factores tanto genéticos como ambientales y su incidencia varía de acuerdo con el fototipo y el grado de exposición solar. Si bien en cierto que existe susceptibilidad individual o familiar de padecer este cáncer, la mayoría de los casos de melanoma son esporádicos y la evidencia de estudios genéticos recientes sugiere que las mutaciones en genes claves como BRAF, NRAS, PTEN O TP53 participan de forma directa en la patogénesis del melanoma y el desarrollo de subtipos específicos. Existen estudios donde se afirma que el fototipo oscuro confiere hasta 4.5 veces protección contra el desarrollo de melanoma, sin embargo en nuestra población esto no es aplicable del todo ya que el principal subtipo prevalente es el acral lentiginoso y no tiene relación ni con fotoexposición ni con el fototipo, por lo que resulta necesario conocer el comportamiento biológico en nuestra población

OBJETIVOS: Describir las mutaciones oncogénicas de B-RAF V600E, N-RAS y la inmunomarcación de C-KIT en los casos de melanoma diagnosticados en el Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

MATERIALES Y MÉTODOS: se incluyeron biopsias de piel con diagnóstico de melanoma en el servicio de dermatología del 2006 a 2012 que tuvieran tejido suficiente y se les realizó inmunomarcación con CD117 para C-kit, así como determinación de mutación en B-RAF V600E y N-RAS mediante PCR.

RESULTADOS: se incluyeron 48 melanomas, de los cuales el 56.3% correspondió al género femenino y 43.8% al masculino, con una edad promedio de presentación de 54.56 años, el 68% de los pacientes procedía del Distrito Federal. El tiempo de evolución con la lesión fue de 2.84 años. La topografía predominante fueron las extremidades con el 64.6%, principalmente la inferiores con 47.9%. El principal subtipo histológico encontrado es el acral lentiginoso en 54.2%. El 68.75% eran melanomas invasores con un Breslow de 2.77mm en promedio, y con presencia de ulceración en el 37.5% de los casos

CONCLUSIONES: El melanoma continúa incrementando su incidencia, con altas tasas de mortalidad, en México no existen trabajos sobre el peculiar comportamiento de este tumor en población mestiza. Los subtipos prevalentes en nuestra población correlacionan con agresividad y pobre pronóstico. Existe poca cultura de autoexploración por lo que estos pacientes continúan llegando en estadios avanzados. La tendencia actual es clasificar a los melanomas según la mutación expresada y de aquí el tratamiento a elegir. Es importante continuar con investigación institucional en estos pacientes, buscando ofrecerles una mejor sobrevida con el desarrollo de terapias blanco.

ABSTRACT:

INTRODUCTION: Skin cancer is the second of all malignancies in Mexico, and this, melanoma is third followed by basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma with less than 9%. According to statistics from the National Registry of tumors, melanoma has a prevalence of 1 per 100,000 population in our country, with an increase in the last 20 years of 500%. Although melanoma is not a public health problem remains the tumor with a mortality exceeding 80%. Among the risk factors for the development of this tumor excel both genetic and environmental factors and the incidence varies according to skin type and degree of sun exposure. While there is some individual or family susceptibility of breast cancer, most cases are sporadic melanoma and evidence of recent genetic studies suggest that mutations in key genes such as BRAF, NRAS, PTEN or TP53 directly involved in the pathogenesis of melanoma and the development of specific subtypes. There are studies stating that the dark phototype up to 4.5 times confers protection against the development of melanoma in our population but this does not apply at all because the main prevalent subtype is acral lentiginous and has no relation with nor photoexposure phototype, making it necessary to know the biological behavior in our population

OBJECTIVES: To describe the oncogenic mutations of B-RAF V600E, N-RAS and C-KIT immunostaining in cases of melanoma diagnosed at the Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

MATERIALS AND METHODS: We included skin biopsies diagnosed with melanoma in the dermatology service from 2006 to 2012 they had sufficient tissue was performed with CD117 immunostaining for C-kit, as well as determination of mutation in B-RAF V600E and N PCR-RAS.

RESULTS: We included 48 melanomas, of which 56.3% were female and 43.8% male, with an average age of presentation of 54.56 years, 68% of patients came from the Federal District. The time evolution of the injury was 2.84 years. The predominant topography were the extremities in 64.6%, mainly lower with 47.9%. The main histological subtype is acral lentiginous found in 54.2%. The 68.75% were invasive melanomas with a Breslow 2.77mm on average, and presence of ulceration in 37.5% of cases

CONCLUSIONS: Melanoma incidence continues to increase, with high mortality rates in Mexico, no studies on the peculiar behavior of this tumor in the mestizo population. The subtypes prevalent in our population correlate with aggressiveness and poor prognosis. There is little culture of self-exploration so that these patients continue to arrive in advanced stages. The current trend is to classify melanomas expressed as mutation and hence the treatment of choice. It is important to continue with research institutions in these patients, seeking to offer a better survival with the development of targeted therapies.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de piel constituye en México el segundo lugar de las neoplasias malignas (1).

Dentro de este, el melanoma ocupa el tercer lugar seguido del carcinoma basocelular y del epidermoide, con una frecuencia menor al 5%, sin embargo representa más del 80% de muertes atribuibles al cáncer cutáneo.

El melanoma es una neoplasia derivada de los melanocitos, los cuales se encuentran de forma predominante en la unión dermoepidérmica, pero también pueden encontrarse en otros tejidos como matriz de pelo, epitelio de retina, úvea y oído interno.(2)

A diferencia de otras neoplasias, el melanoma ha registrado un incremento en su incidencia no sólo en países como EUA o Australia en donde el riesgo de desarrollar melanoma es de 1 por cada 55 habitantes mientras que en México según estadísticas del Registro Nacional del Cáncer y del Registro Histopatológico de Neoplasias en México es de 1 por cada 100,000 habitantes (1,3,4) a diferencia de lo citado en algunos estudios, donde el hecho de tener fototipo oscuro IV-V confiere hasta 4.5 veces menos riesgo de desarrollar cáncer de piel relacionados con fotoexposición, es controvertido el papel que juega en nuestra población el melanoma acral lentiginoso que no guarda relación con lo anterior a diferencia de lo citado en la bibliografía mundial con respecto a la mayor incidencia de melanoma de extensión superficial reportado en población de raza blanca y que está íntimamente ligado a fotoexposición(5,6).

El riesgo de desarrollar melanoma, depende tanto de factores genéticos como ambientales y su incidencia varía de acuerdo con el fototipo y el grado de exposición solar. Si bien es cierto que existe susceptibilidad individual o familiar de padecer este cáncer, la mayoría de los casos de melanoma son esporádicos y la evidencia de estudios genéticos recientes sugiere que las mutaciones en genes claves como BRAF, NRAS, PTEN O TP53 participan de forma directa en la patogénesis del melanoma y el desarrollo de subtipos específicos.

(15)

Existen cuatro subtipos histológicos más frecuentes: melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, lentigo maligno y acral lentiginoso. Además hay otros mucho menos frecuentes como son el melanoma de células balonzantes, amelánico, desmoplásico, mucosas, de células fusiformes y/o epiteliodes. (7)

El melanoma de extensión superficial constituye el subtipo más frecuente de melanoma en pacientes de raza blanca con un 70% del total del cáncer de piel tipo melanoma (CPM) y está íntimamente relacionado con exposición solar intermitente por lo que se localiza en el tronco, miembros. Es común en pacientes en la cuarta década de la vida y proviene de una lesión preexistente, presentando una fase de crecimiento radial. A nivel molecular frecuentemente presenta pérdidas completas o de segmentos cromosómicos y mutaciones en B-RAF entre el 40-80% según la población. (19)

En segundo lugar se encuentra el melanoma nodular con 15% de todos los CPM; este se caracteriza por sólo presentar crecimiento vertical.(8,9)En algunos trabajos se habla que en población mexicana constituye el subtipo más frecuente, sin embargo en un estudio retrospectivo de 112 pacientes, Karam y colaboradores (20) encontraron mayor prevalencia del acral lentiginoso lo cual se confirma con las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología de México del 2010. Aunque se desconoce su etiología, se ha relacionado con deleciones a nivel de Ip36 hasta en el 60%, y su topografía habitual es tronco, cabeza, cuello y extremidades inferiores, sobre todo en el sexo femenino (19)

En orden de frecuencia le sigue el lentigo maligno con 13% el cual se relaciona a fotoexposición crónica, se presenta después de los setenta años de edad. Clínicamente se observan lesiones planas y oscuras lo cual ayuda a realizar un diagnóstico temprano. A diferencia de los demás, este subtipo no se ha relacionado con alguna alteración genética en particular. (19)

(16)

En último lugar el acral lentiginoso siendo una forma rara con el 2-3% del total, se localiza principalmente en extremidades, sobre todo inferiores en donde afecta palmas y plantas, y el cual constituye un reto ya que al encontrarse en un sitio no fotoexpuesto se ha tratado de encontrar un comportamiento biológico específico, o bien factores raciales que lo hagan más frecuente en otras razas como la negra cuya prevalencia de melanoma acral lentiginoso es la más alta con 36%, seguido por los asiáticos e isleños del Pacífico con el 18%, hispanos blancos con el 9% y 1% en pacientes blancos no hispanos. (7)

No existen estudios grandes en países europeos o de Norteamérica sobre la prevalencia de este subtipo por ser más frecuente en Latinoamérica o Asia, por lo tanto casi no se encuentran mutaciones relacionadas con sitios expuestos a radiación ultravioleta intermitente, donde B-RAF es de las principales alteraciones.

Lo que se sabe de la patogenia en el melanoma acral lentiginoso es que esta relacionada con la activación de ciertas vías de señalización como la sobreexpresión de ciclina D1 o bien por la amplificación y ganancias cromosómicas durante la carcinogénesis temprana. (8,9,19)

El pronóstico en los pacientes con melanoma acral es pobre, por lo que es importante describir el porcentaje de mutaciones en nuestra población para que posteriormente se puedan desarrollar o aplicar terapias blanco dirigidas para mejorar la sobrevida de estos pacientes. (10,11).

Clark et al, definieron las características de los principales tipos de melanoma en relación con su patrón de crecimiento, agresividad, distribución de la pigmentación o ausencia de la misma, lugar de presentación, tiempo de evolución así como el grupo étnico donde se presentan con mayor frecuencia.

Se ha valorado el sistema nemotécnico para el criterio diagnóstico de los melanomas que es el **ABCDE** el que refiere:

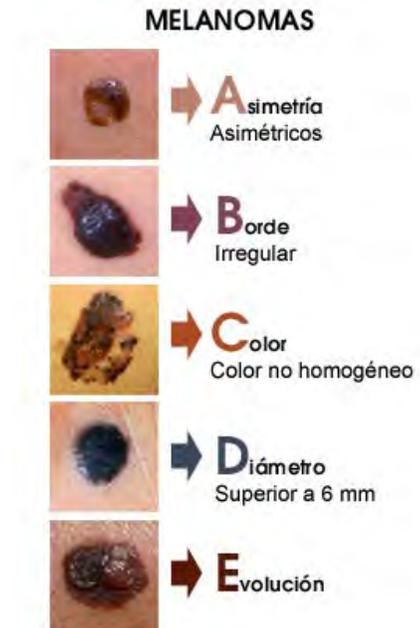
A= área de crecimiento rápido e irregular

B= asimetría de los bordes

C= variaciones en el color

D= aumento en el diámetro de la lesión

E= rápida evolución



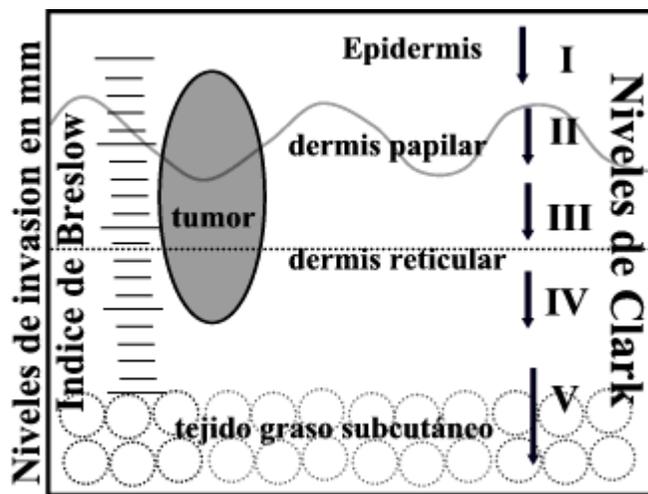
Cuadro 1. Ejemplificación del ABCDE para el diagnóstico de melanoma

Esta guía de exploración permite un diagnóstico más oportuno y se puede distribuir entre la población, para que a su vez sea efectuada una autoexploración, con lo que nos ayudaría a disminuir la tasa de mortalidad en los países en los que el melanoma es frecuente.

Clark et al, implementaron un sistema que evalúa la invasión del melanoma a nivel de la epidermis, dermis, hasta llegar al tejido celular subcutáneo, comprendiendo 5 niveles

NIVELES DE CLARK

- 1.- confinamiento a la epidermis (in situ)
- 2.- invasión de la dermis superficial
- 3.- Invasión de la unión de la dermis papilar con la dermis reticular
- 4.- invasión de la dermis profunda
- 5.- invasión de tejido celular subcutáneo



Cuadro 2. Niveles de Clark

Cuando el análisis histopatológico no permite definir el diagnóstico de melanoma se recurre a marcadores inmunohistoquímicos, por lo general se emplean anticuerpos monoclonales que detectan antígenos, para valorar la expresión de las células del melanoma como son HMB-45, S-100, MELAN-A MART. Sin embargo estos antígenos no son específicos del tumor y se pueden expresar en tejidos sanos e inclusive en otros tumores.

Además existen otros factores o marcadores histopatológicos que nos ayudan a establecer un pronóstico y una manera de proceder ante el diagnóstico de melanoma como lo es el BRESLOW el cual es un sistema de medición utilizado para establecer el grado de crecimiento vertical de un tumor en milímetros. Dicha medición va desde 0.1mm hasta mas de 4 mm. De esto depende el

manejo interdisciplinarios y la realización de estudios de extensión para descartar diseminación local, regional o a distancia.

2. ANTECEDENTES

El principal factor de riesgo genético para el desarrollo de melanoma resulta de alteraciones en el gen inhibidor de la cinasa dependiente de ciclinas 2A (CDKN2A), el cual codifica para dos proteínas diferentes aunque estrechamente relacionadas, la p16/INK4 y p14/ARF. Dichas proteínas participan en la regulación de la división celular y la apoptosis, necesarias para el mantenimiento de la homeostasis celular. Otros genes importantes son CDK4/6 y RB1 los cuales fungen como supresores tumorales, y actúan en colaboración con otras moléculas como MITF el cual también desempeña un papel crucial en la regulación del ciclo celular.

MITF puede actuar como un factor de transcripción antiproliferativo que induce la inhibición del ciclo celular dependiente de la activación de p21, la cual es una proteína dependiente de cinasas de ciclina encargadas de la inhibición del ciclo celular. Además la sinergia entre la proteína del retinoblastoma (RB1) y MITF potencializa la habilidad de este último para activar la transcripción de p21 lo que contribuye a la salida del ciclo celular y a la activación del programa de diferenciación. Las mutaciones de los genes asociados con melanoma como INK4a y BRAF afectan la relación entre MITF y RB1 resultando en la incapacidad del primero sobre el control del ciclo celular. (12)

La vía MAPK (mitogen-activatedproteinkinase) también conocida como ERK (extracellular-relatedkinase) desempeña un papel crucial en la proliferación y supervivencia de múltiples líneas celulares, siendo su activación el paso inicial en la proliferación de melanocitos. Esta vía de señalización intracelular incluye cuatro cinasas: RAS, RAF, MEK y ERK. En los melanomas, se han

(20)

detectados mutaciones en la cinasa N-RAS (15-30%)^{8,9} y de B-RAF en un 50-60%.^(13,14) Ambas mutaciones son excluyentes entre sí. La mutación de cualquiera de estas cinasas causa la activación permanente de esta vía, lo que en un principio debería determinar la proliferación continuada de las células.

En concreto, la activación de la vía MAPK desencadenada por la mutación de BRAF, se controla en los melanocitos humanos aumentando la expresión del inhibidor de la cinasa INK4. Para que se produzca una progresión a melanoma debe añadirse otra mutación en alguno de los genes supresores de tumores encargados de detener la progresión iniciada por la mutación en la vía de la MAPK.

En los melanomas familiares existe una mutación en el gen CDKN2A hasta en el 40% de los casos. En los melanomas no familiares la mutación existe en PTEN.

La mutación característica de BRAF, suele ocurrir como consecuencia a exposición a la luz UV intensa e intermitente dada como consecuencia de quemaduras solares durante la niñez como brazos y tronco (59%), y más raros en los acrales (11%), y prácticamente ausente en los uveales⁽¹⁵⁾

Otra de las vías implicadas en el desarrollo de ciertos subtipos de melanoma es la del protooncogen KIT, que codifica un receptor transmembranal dependiente de tirosina-cinasa cuyo ligando es el factor de células madre (SCF), un factor de crecimiento fundamental en la hematopoyesis, y en la formación de otros tipos celulares, como los melanocitos. Las mutaciones en el receptor KIT causan su activación de forma permanente sin necesidad de unirse a su ligando.

Aunque la participación de la vía alterada de KIT en la patogenia del melanoma no se conoce con exactitud, Curtin y cols., encontraron mutaciones o aumento en el número de copias del gen KIT en

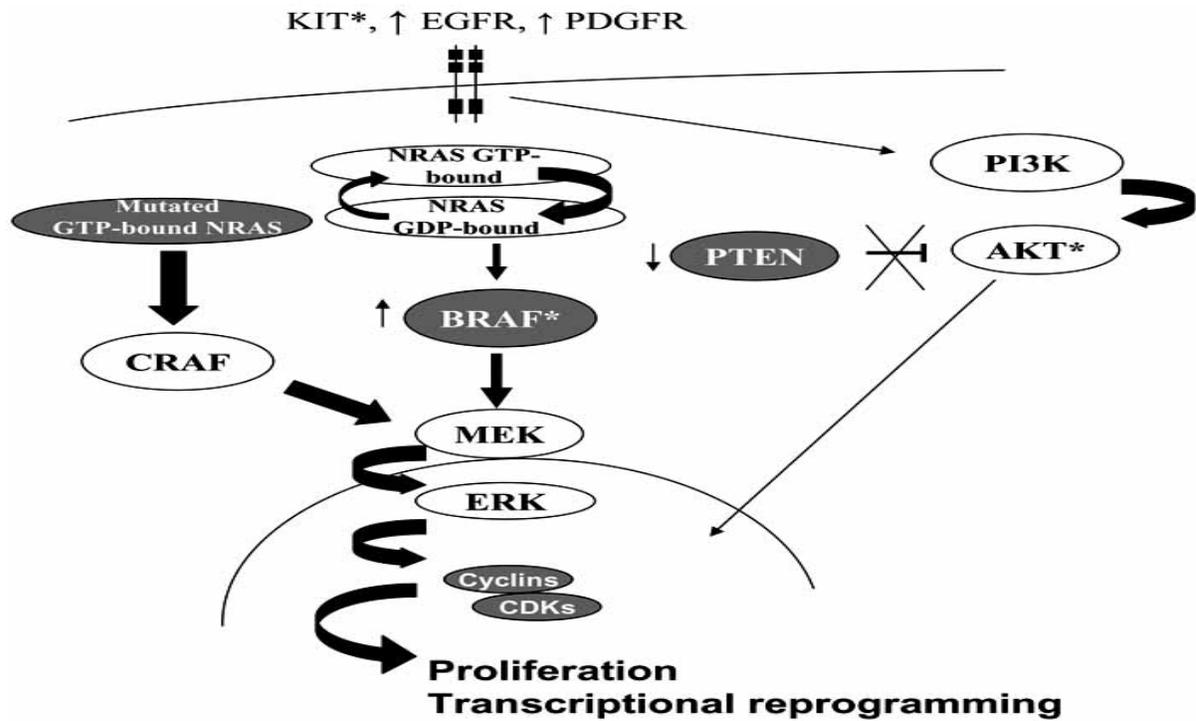
(21)

melanomas mucosos y acrales, y en menor medida de aquellos en piel con exposición solar crónica.(16,17)

Por lo tanto se ha encontrado que los melanomas con dicha alteración están caracterizados por un patrón de crecimiento lentiginoso, cuyas células se disponen de forma aislada antes de invadir la dermis. Una tercera alteración en esta vía es la presencia de una activación constitucional de CDK4.

Referente a esta última, se ha demostrado la existencia de un grupo de melanomas sin mutaciones en la vía MAPK que sobreexpresan tanto la vía KIT como la CDK4, lo que se traduce en falla terapéutica con los inhibidores de BRAF.

En conclusión, con el advenimiento de la biología molecular, se nos abre un mundo de posibilidades en el tratamiento del melanoma, y es por eso la importancia de saber seleccionar a los pacientes para recibir la terapéutica adecuada de acuerdo al tipo de mutación, y esta se puede sospechar, de acuerdo a la topografía del melanoma, así como su patrón familiar .



Cuadro 3. Principales vías moleculares implicadas en la génesis del melanoma

3. JUSTIFICACIÓN

El melanoma, al ser uno de los tumores con mayor mortalidad, es también uno de los más estudiados, encontrándose variaciones tanto topográficas y de comportamiento biológico que dependen de la población estudiada. Un ejemplo es la alta prevalencia de melanoma de extensión superficial presente en la raza blanca y la cual está relacionada con mutaciones a nivel de B-RAF hasta en 60%, en comparación con la poca información que existe sobre las mutaciones en c-kit en el acral lentiginoso por ser éste un tumor poco frecuente en este grupo poblacional menor al 3%.⁽²¹⁾ La importancia de este trabajo radica en describir las mutaciones encontradas en los pacientes de nuestro servicio, en donde el principal subtipo de melanoma es el acral lentiginoso, así como establecer la aplicabilidad en estudios ulteriores de la llamada terapia dirigida con el objetivo de mejorar la supervivencia en estos pacientes, algo que ya se está realizando en la actualidad en países europeos o en Norteamérica. Un ejemplo son mesilato de imatinib útil en pacientes con

(23)

alteración en la vía de señalización de tirosin-cinasa(22); el ipilimumab molécula encargada de modificar la respuesta celular mediada por linfocitos T contra células tumorales y que ha tenido una discreta mejoría en la supervivencia(23), o bien la molécula recientemente aprobada por la FDA, específica para aquellos pacientes que presentan mutaciones en el codón V600E de BRAF, la mayoría de estos presentes en melanomas de extensión superficial, llamado vemurafenib indicado en el tratamiento de tumores metastásicos, con resultados muy promisorios.(24)

Con todo esto, es necesario abrir el panorama en México y describir cuáles son las mutaciones encontradas en nuestros melanomas para ofrecerles una mejor calidad de vida a estos pacientes

4. HIPÓTESIS

Al ser este un estudio descriptivo no se requiere este apartado

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Describir las mutaciones oncogénicas de B-RAF, NRAS y la inmunomarcación de C-KIT en los casos de melanoma diagnosticados en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

Conocer el comportamiento biológico del melanoma en nuestra población para establecer la utilidad de las terapias blanco desarrolladas y utilizadas en pacientes de raza blanca con diagnóstico de melanoma como lo son vemurafenib, ipilimumab, sorafenib, nilotinib

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Tipo de Estudio

Transversal descriptivo

6.2. Ubicación Temporal y Espacial

Biopsias excisionales de piel dagnosticadas como melanoma e incluidas en bloques de parafina en el servicio de dermatopatología de la división de dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de Enero 2006 a Marzo del 2012.

6.3. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión

Biopsias de piel con diagnóstico inequívoco de melanoma mediante histopatología por la presencia de nidos de células névicas, poco o nada cohesivos, con pleomorfismo, con mitosis atípicas, donde se pudiera medir tanto el crecimiento vertical del tumor y el grado de invasión o bien mediante inmunomarcación con anticuerpos monoclonales como S-100, HMB45, MELAN-A, MART; sin importante topografía, subtipo histológico, estadio y desenlace que fueran incluidas en bloques de parafina en el departamento de dermatopatología de la división de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el período Enero 2006 a Marzo del 2012.

Criterios de no Inclusión

Aquellos bloques que aunque estuvieran etiquetados como melanoma no correspondieran con dicho diagnóstico al ser revisados en h/e.

Criterios de Exclusión

Todos aquellos bloques de parafina que no contengan tejido suficiente para la realización de los cortes necesarios para el procesamiento y extracción del ADN o la inmunomarcación para CD117, o bien que el tejido estuviera dañado para el mismo fin.

Criterios de Eliminación

Que durante el procesamiento de las muestras, para PCR e inmunohistoquímica se requirieran nuevos cortes y ya no hubiera material suficiente para su realización.

6.4. Variables

Las variables de interés para este estudio son cualitativas, nominales y dicotómicas y se expresarán solamente como positivo o negativo en función de la presencia o ausencia de la mutación o inmunomarcación.

El resto de variables que se presentan como parte de las características de la población no son de relevancia para este estudio, sin embargo se mencionan como:

Sexo- cualitativa dicotómica

Edad- cuantitativa

Topografía- politómica ordinal

Subtipo histológico- politómica ordinal

Crecimiento vertical (Breslow)- politómico ordinal

Nivel de Clark- politómico ordinal

MARCADOR	POSIBLE RESULTADO POSITIVO-NEGATIVO
B-RAF	
NRAS	
C-KIT	

6.5. Tamaño de la Muestra

Se incluyeron todos los melanomas diagnosticados en el período de tiempo antes descrito con un total de 76.

6.6. Métodos de Laboratorio

Primero se obtuvo la base de datos de los melanomas del servicio de dermatopatología de la división de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el período Enero del 2006 a Marzo del 2012, se localizaron los bloques existentes que correspondan a dicho período, se revisaron las laminillas correspondientes a cada caso y en caso de duda se realizó un rebaje para corroborarse el diagnóstico y examinarse detenidamente junto con la Dra. Sonia Toussaint Caire, además se corroboró que la cantidad de tejido contenida en el bloque fuera la suficiente para la obtención de material biológico.

A las muestras que cumplieron con lo anterior , se les realizaron 6 cortes de 3 mcs cada uno en el caso de B-RAF siendo manejados y enviados de forma estéril en tubos Ependorff al laboratorio de biología molecular del Instituto Nacional de Cancerología donde serán procesadas las muestras, se conseguirán los cebadores para exones 11 y 15 de B-RAF se realizará la identificación de

mutaciones oncogénicas mediante el análisis de fusión de alta resolución y amplificación de los productos de PCR obtenidos de material biológico de muestras embebidas en parafina.

En el caso de c-kit se cargaron las laminillas en blanco, colocándose dos casos por laminilla con un solo corte de 4 micras a los cuales se les realizó la tinción especial con el anticuerpo CD117 en una dilución de 1:400, como cromógeno se utilizó la diaminobenzidina; y los mastocitos que son positivos para CD117 sirvieron como controles.

En cuanto a determinación de NRAS se utilizará el ensayo de PCR en tiempo real basado en la tecnología Scorpions de DxS para detectar mutaciones del gen KRAS en ADN genómico normal obtenido de biopsias fijadas con formalina y embebidas en parafina Si se dispone de suficientes copias de ADN, existe la posibilidad de detectar aproximadamente un 1% de mutaciones del gen K-Ras en los codones 12 y 13 del oncogen K-RAS. Dependiendo del kit a utilizar se podrán analizar un promedio de 20 a 80 muestras por kit.

El Scorpions es una técnica de moléculas bifuncionales que contiene un cebador de PCR unido covalentemente a una sonda. El fluoruro de esta sonda interactúa con un quencher o silenciador, también incorporado en la sonda lo que reduce la fluorescencia. Durante la reacción de PCR, cuando la sonda se une al amplicón, se separan el fluoruro y el silenciador. El resultado es un aumento de la fluorescencia en el tubo de reacción. El punto en que se detecta una señal superior a la lectura de fluorescencia de referencia se denomina ciclo umbral (ct).

EL cálculo de los valores de ΔCt de una muestra se obtiene de la diferencia entre el valor de Ct del ensayo de mutación y el valor de Ct del ensayo de control de una misma muestra. Las muestras se clasifican como positivas para mutaciones si su valor de ΔCt es inferior al valor de ΔCt del 1% correspondiente a dicho ensayo.

El kit de K-RAS tiene el marcado CE para su uso con fines de diagnóstico in vitro con el sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Equipo II) de Roche Diagnostics (Equipo LightCycler® 480)

(28)

con 96 pocillos, número de referencia de Roche: 05015278001, o el Sistema de PCR en tiempo real 7500 de AppliedBioSystems, número de referencia 4351105(ABI7500).

Finalmente se realizó el análisis final de los datos obtenidos para su publicación y posterior aplicación clínica.

6.7. Análisis Estadístico

Se utilizó únicamente estadística descriptiva resumiendo los resultados en: frecuencias y porcentajes

7. RESULTADOS

De un total de 76 melanomas encontrados en la base de datos del servicio de dermatopatología en el período de tiempo antes mencionado, se excluyeron 10 bloques por no encontrarse disponibles en el servicio, dos bloques no correspondían con el diagnóstico de melanoma descrito en la base de datos, 4 bloques correspondían a ampliación de márgenes en los cuales no se encontró ya evidencia de tumor, 12 bloques tuvieron que ser excluidos por no contar con tejido suficiente para la extracción de ADN, quedando un total de 48 melanomas.

En cuanto a la frecuencia por género se encontró discreta superioridad en el femenino con un total de 27 pacientes (56.3%) y 21 varones (43.8%).

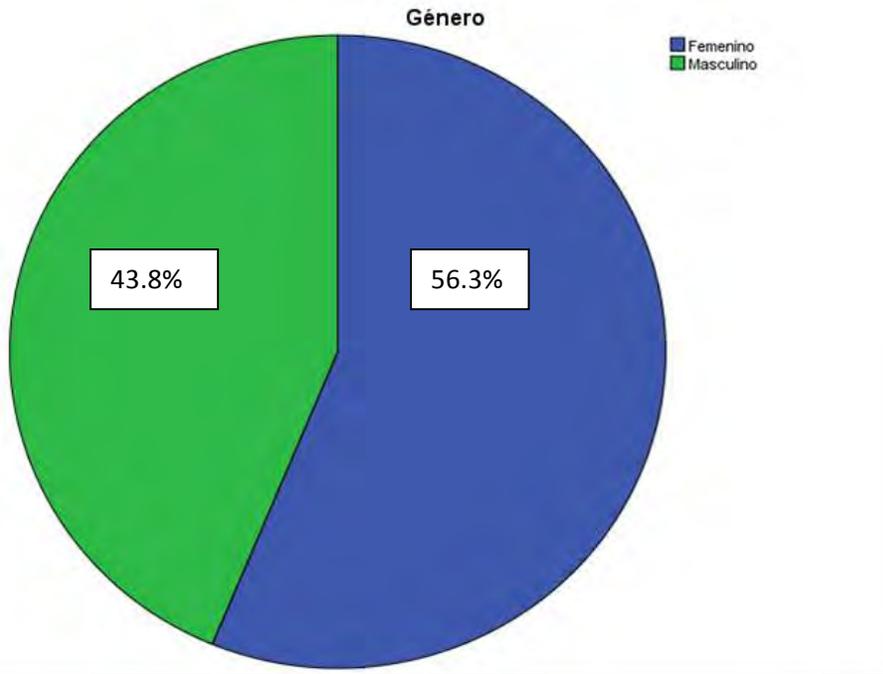


Fig. 1 Frecuencia de melanoma en relación al género

En cuanto a la distribución de melanoma por edad, el paciente con menor edad fue de dos años, y el mayor de 98 años con una media de 54.56 años.

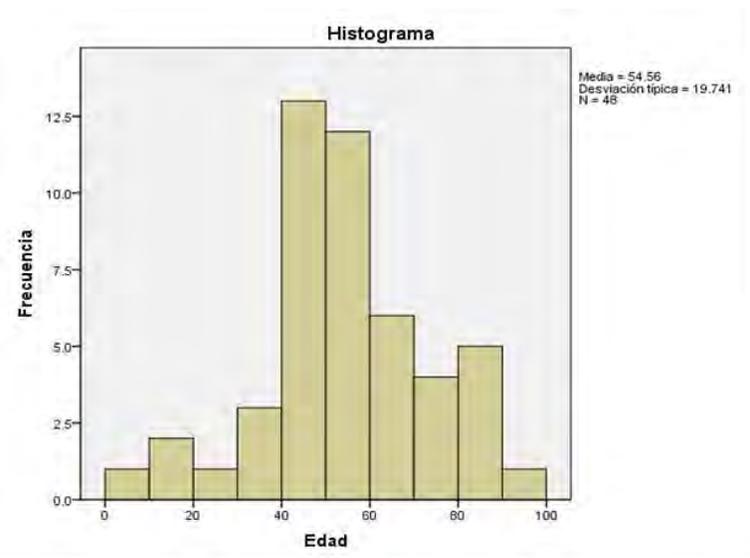


Fig 2. Distribución por edad

El principal lugar de procedencia de los pacientes con melanoma detectados en nuestro servicio fue el Distrito Federal con 68%, seguido del Estado de México con 11% del total, en tercer lugar Oaxaca con 9% y en menor proporción Guerrero (4%), Guanajuato (4%), Hidalgo (2%) y Chiapas (2%).

□

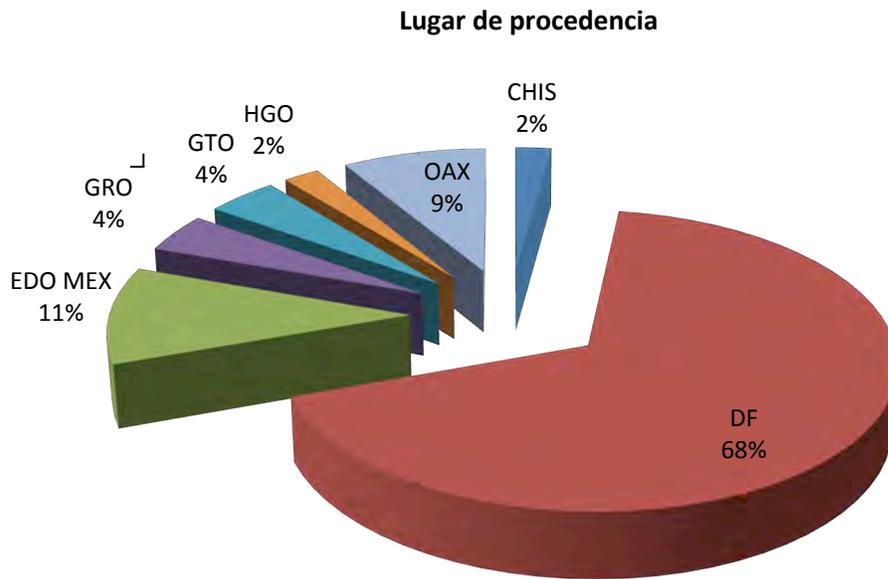


Fig 3. Lugar de procedencia de pacientes con diagnóstico de melanoma

El tiempo promedio de evolución que los pacientes referían tener con la lesión, bien desde la lesión melanocítica (nevo) o hasta la presentación de tumoración visible fue de 2.84 años con un mínimo de 1 mes desde la percepción de la lesión hasta un máximo de 30 años.

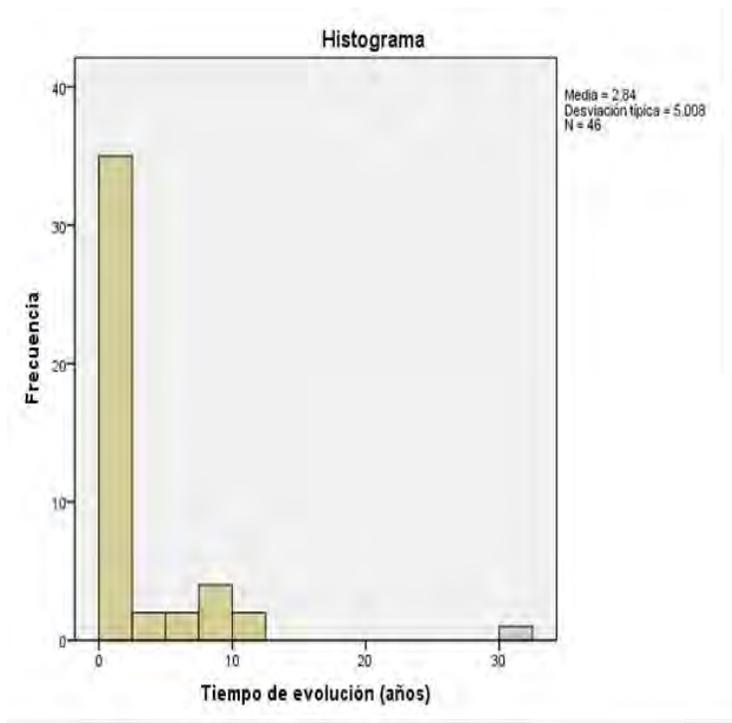


Fig 4. Tiempo de evolución promedio en años con el melanoma

La principal topografía afectada en nuestro estudio fueron las extremidades con un total 64.6%, con predominio de las extremidades inferiores con 47.9% y las superiores con 16.7%. El segundo lugar de topografía correspondió para la cabeza y el cuello con el 22.9% seguido por el abdomen y tronco con 12.5%.

Encontramos que el subtipo histológico acral lentiginoso continúa como el principal con el 54.2% del total (26 pacientes), seguido por el lentigo maligno melanoma en 9 pacientes (18.8%), melanoma de extensión superficial con el 16.7% (8 pacientes), y el nodular con 10.4% (5 pacientes).

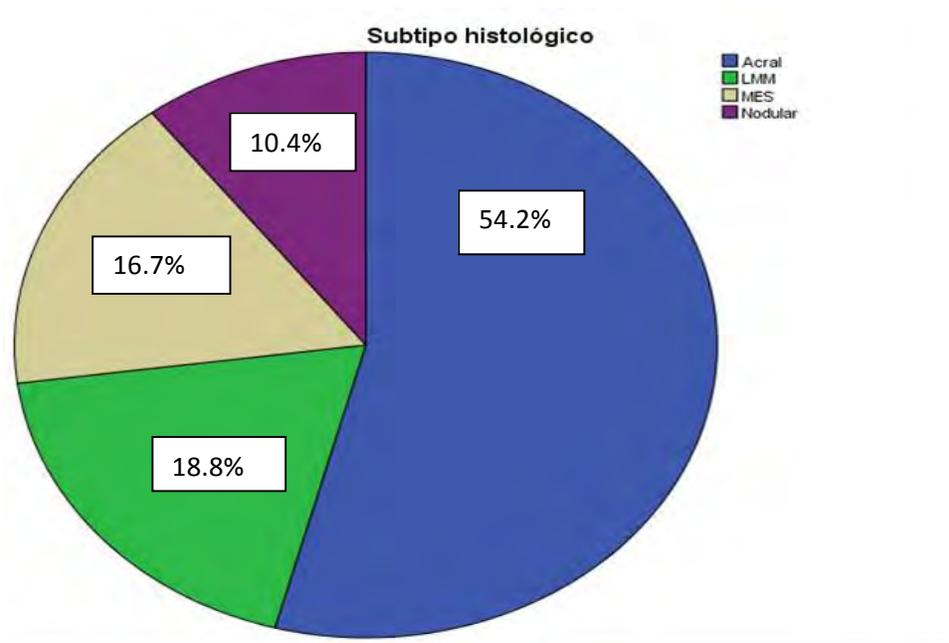


Fig 5. Frecuencia de los subtipos histológicos

La frecuencia de mutaciones encontradas en nuestros pacientes para c-kit fue positiva 15 de nuestros pacientes (31.25%) de los cuales 9 correspondieron a melanomas del subtipo acral lentiginoso, 4 al subtipo melanoma de extensión superficial, 1 nodular y 1 a lentigo maligno melanoma.

En cuanto a la mutación en B-RAF V600E sólo el 6.25% (3 pacientes) fue positiva en nuestro estudio, encontrándose 2 (66.6%) en melanomas acrales y 1 en lentigo maligno melanoma.

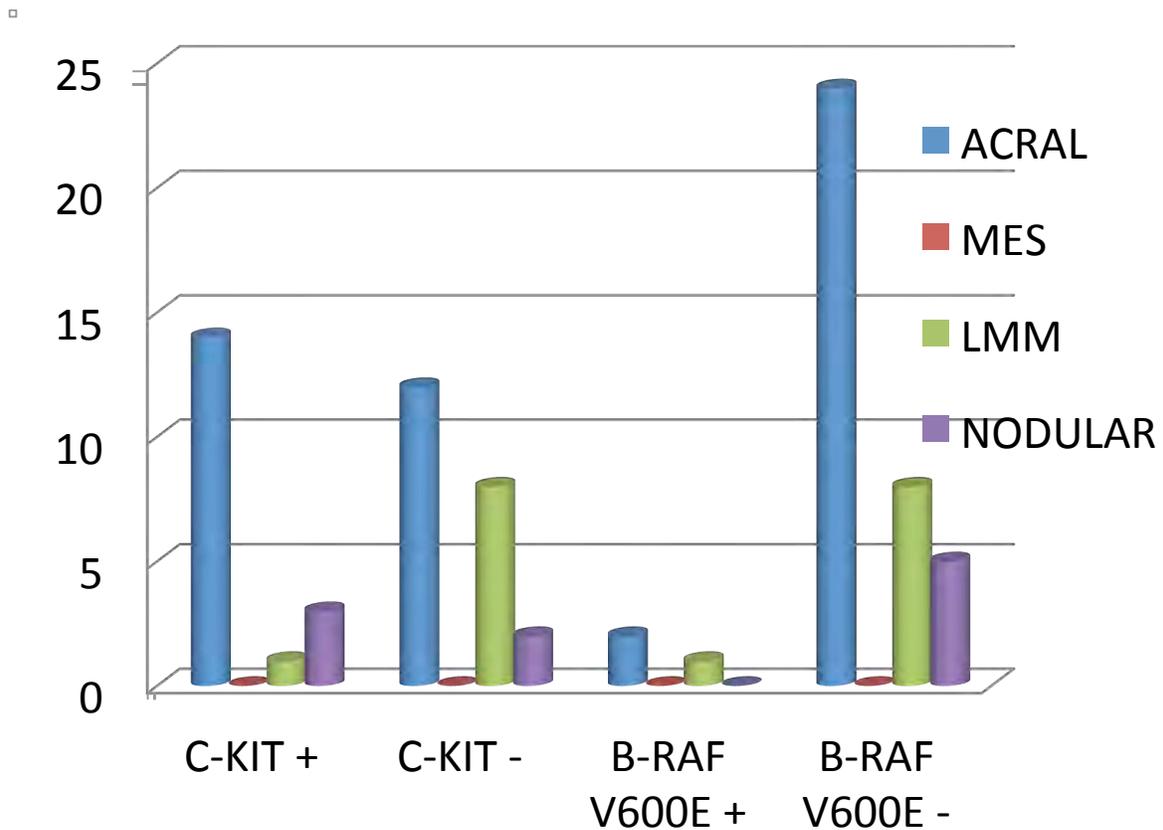


Fig 6. Relación de mutaciones según subtipo histológico de melanoma.

En la secuenciación de ADN realizada para la mutación en B-RAF codón V600E se observa la sustitución de una timina por un ácido glutámico, siendo este codón donde se encuentran la mayoría de las mutaciones del gen B-RAF, y en menor porcentaje en V600K.

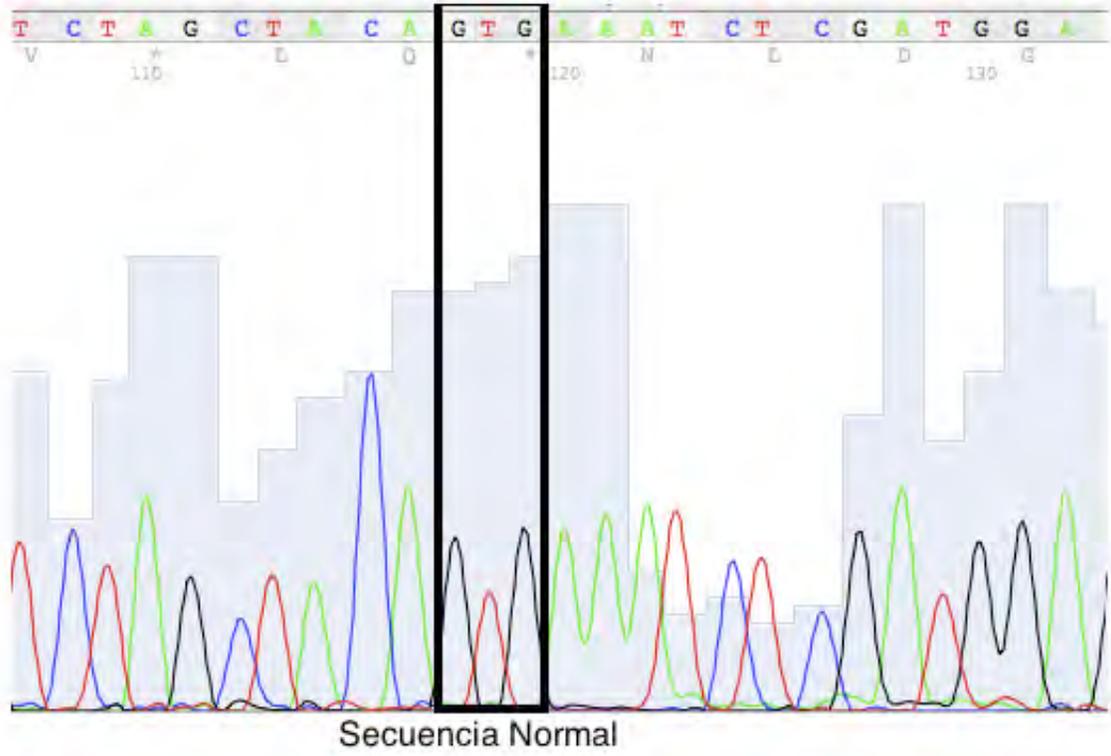


Fig.7 secuencia normal del gen B-RAF V600E

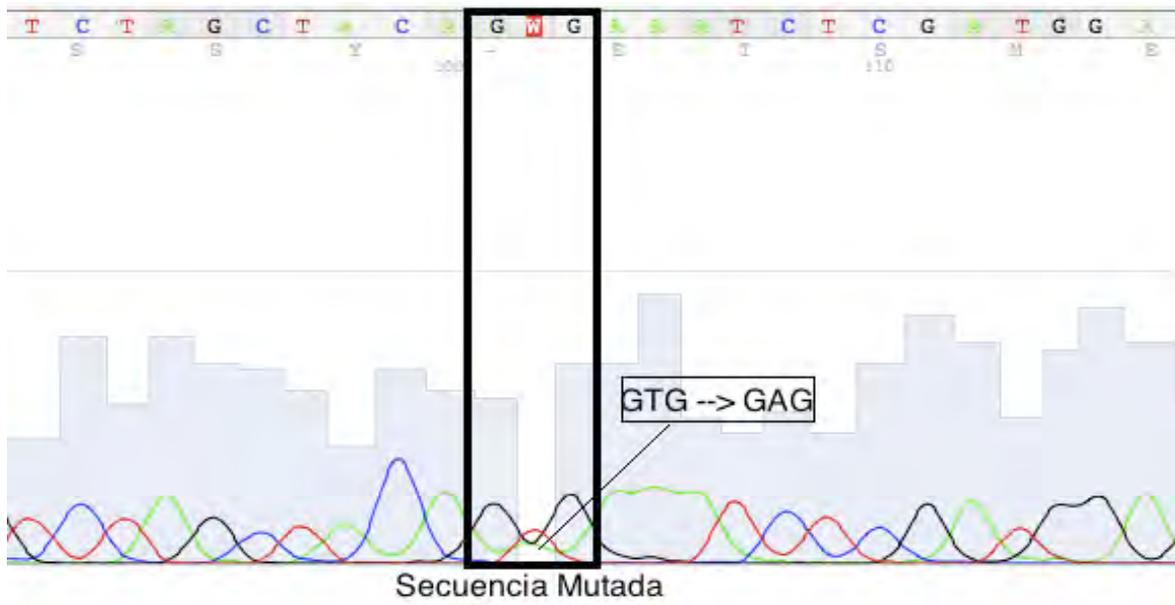


Fig 8. Secuencia mutada en B-RAF V600E

En las muestras positivas para C-kit (CD117) se observó la tinción del citoplasma de las células con dicha mutación en color rojo.

Dicha mutación puede expresarse de acuerdo al predominio de positividad de células neoplásicas con positividad para la mutación como: profundidad cuando las células afectadas presentan invasión a tejidos más profundos; central cuando la mayoría de las células mutadas se presentan al centro de la tumoración, o bien cuando sólo afectan la unión dermoepidérmica.

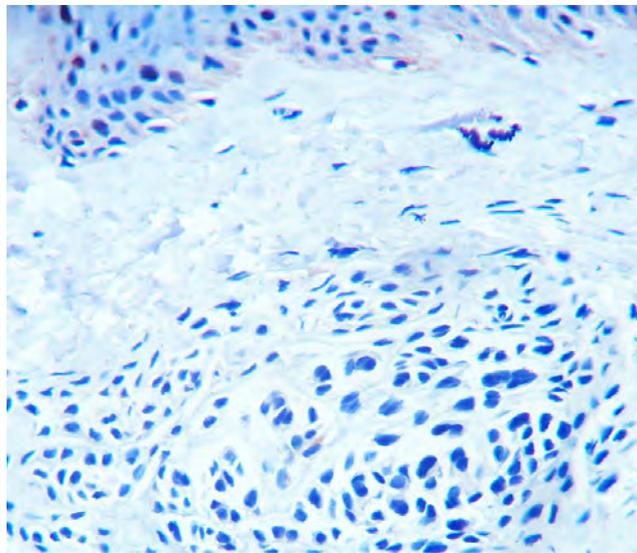
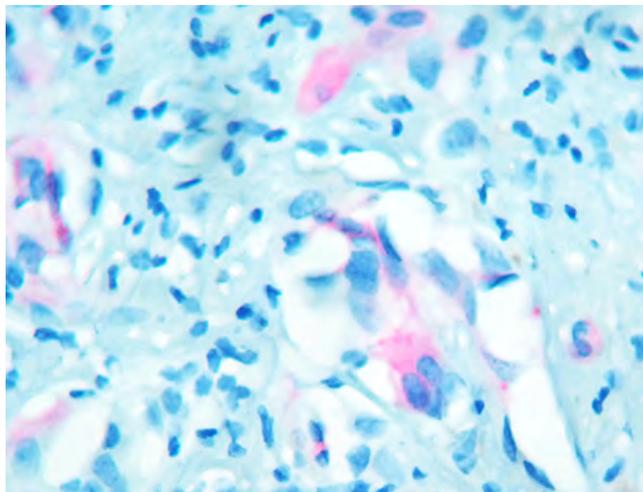


Fig 9 Melanoma negativo para C-Kit



(36)

Fig. 10 Patrón citoplásmico de C-Kit positivo

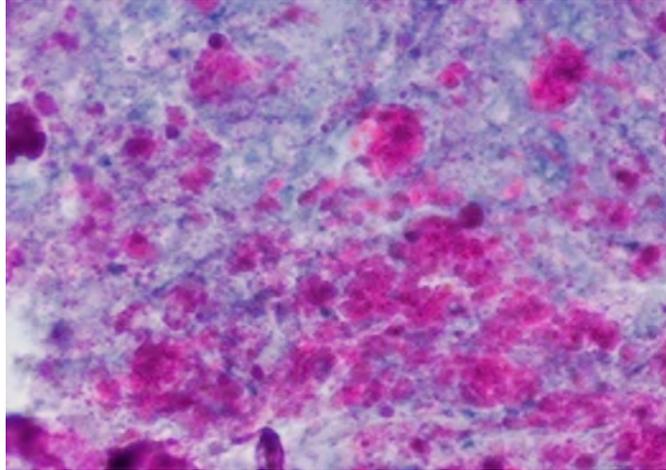


Fig. 11 Predominio de positividad de C-Kit central

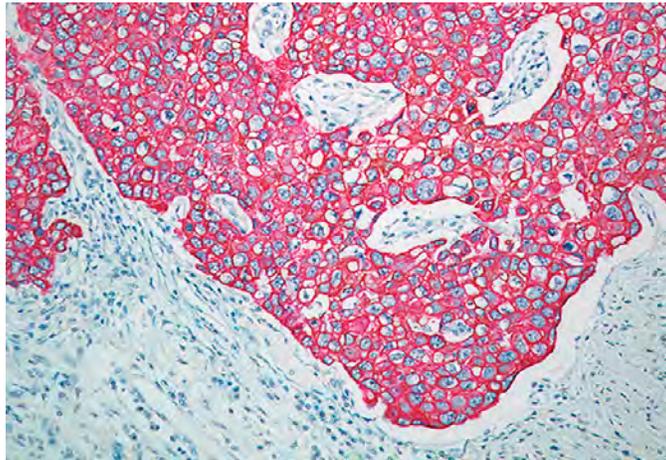


Fig.12 Patrón de positividad a nivel de unión dermoepidérmica para C-Kit

(37)

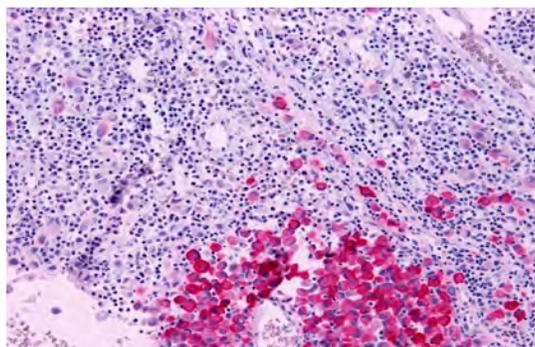


Fig. 13 Patrón de positividad para C-kit que refleja invasión tumoral

De los 48 melanomas incluidos en este estudio, 33 (68.75%), era invasores mostrando un Breslow promedio de 2.77 mm al momento del diagnóstico, además el 37.5% de estos tumores presentaban ulceración, ambos parámetros constituyen los principales factores pronósticos de mortalidad en pacientes diagnosticados con melanoma. El nivel de Clark, si bien es una medición que ya no es requerida según la reglamentación internacional, en muchas instituciones se sigue reportando, y en nuestro estudio encontramos que un alto porcentaje de pacientes eran reportados con niveles de Clark entre II-LV

Tipo	No.	%	Breslow	Clark	B-RAF	C-KIT
LMM	4	8.32%	In situ	-	-	1
LMM Iv	5	10.41%	0.3-12 mm	II-IV	1	-
Acral	3	6.24%	In situ	-	-	-
Acral Iv	23	47.91%	0.3-30 mm	II-IV	2	9
MES	3	6.25%	In situ	-	-	2
MES Iv	5	10.41%	0.4 (38)	I-III	-	2
Nodular	5	10.46%	1.5-4.5mm	IV	-	1
Total	48	100%	NA	NA	3	15

Tabla 1. Tabla general de resultados

8. DISCUSIÓN

El melanoma maligno constituye una neoplasia muy agresiva con 80% de mortalidad en quien lo padece. En nuestro país no constituye un problema de salud pública como lo es en países como Nueva Zelanda, Australia, Gran Bretaña o Estados Unidos en donde la tasa de afección en la población general oscila entre 35-45 por cada 100,000 habitantes,(2) sin embargo en los últimos 20 años se ha registrado en nuestro país un incremento del 500%(1). La importancia del estudio del melanoma radica en que a pesar de los esfuerzos a nivel mundial para disminuir su incidencia, no se ha logrado, y esto en parte relacionado por desconocer el comportamiento biológico de este tumor en las diferentes razas. También es importante señalar que existen otras neoplasias que anteriormente cobraban la vida de miles de pacientes, en la actualidad se ha logrado disminuir de forma sustancial tanto la incidencia como la mortalidad por diversos cánceres como es el de colon, el genitourinario, el cervicouterino, entre otros; sin embargo el melanoma continúa en la lista de los que conlleva mayor morbimortalidad sobretodo en países subdesarrollados.

Actualmente las estadísticas nacionales establecen la incidencia de esta neoplasia en 1:100,000 habitantes, aunque esto se debe a la posible existencia de un subregistro. El género femenino continúa siendo el más afectado con el 56.3% mientras que los varones ocupan el restante 43.8%, muy acorde con lo reportado en series tanto nacionales como internacionales. La media de edad reportada en nuestro estudio es de 54.56 años, la cual se encuentra también dentro del rango reportado a nivel mundial de presentación de melanoma entre la cuarta y la sexta décadas de la vida, aunque existe cierta diferencia de acuerdo con el subtipo histológico, por ejemplo, en el lentigo maligno melanoma se reporta en personas después de los 60 años relacionado con la fotoexposición crónica. (9)

El lugar de origen de los pacientes diagnosticados con melanoma incluidos en este protocolo fue el Distrito Federal con el 68% seguido por el Estado de México y Oaxaca con un 11% y 9% respectivamente, lo cual es de esperarse por la cercanía y la accesibilidad de estos pacientes a nuestro hospital y la facilidad que representa el ser atendido en nuestro servicio, sin importar el lugar de procedencia.

El tiempo de evolución que los pacientes reportan desde la primera vez que notaron la lesión hasta el momento del diagnóstico con la lesión oscila entre 1 mes hasta 30 años, con una media de 2.84 años. Esto es un dato alarmante, lo cual explica porqué según estadísticas recientes del Instituto Nacional de Cancerología de México y el Registro Nacional de Neoplasias, el 75% de nuestros pacientes con diagnóstico de melanoma llegan es estadios IIC-III, lo que conlleva con una disminución muy importante en la sobrevida, a diferencia de lo que se observa en países industrializados como EUA, en donde este porcentaje se invierte, detectando a los pacientes en estadios I-IIA con una sobrevida mayor a 90%, con altas tasas de curación.(25)

La principal topografía reportada en este estudio fueron las extremidades con un 64.6% de las cuales las inferiores ocuparon el 47.9% seguidas de las superiores con el 16.7%, cifras que coinciden con lo reportado tanto en bibliografía internacional en población hispana, así como en estadísticas nacionales.(7) En segundo lugar de afección está cabeza y cuello con el 22.9% seguido en último lugar de tronco y abdomen con el 12.5%. A diferencia de los estudios realizados en población caucásica donde el principal sitio afectado se relaciona con la fotoexposición ya sea intensa e intermitente o bien crónica, también se relaciona con el fototipo claro, en nuestra población ocurre algo muy particular, existen reportes donde se asegura que en hispanos, negros o asiáticos existe un factor protector relacionado con el fototipo que disminuye el riesgo de padecer melanoma, al menos en sitios fotoexpuestos, de 4.5 veces.(7,8) Curiosamente la principal topografía en nuestra población no se relaciona con exposición solar, de aquí la importancia de conocer el comportamiento biológico propio de cada raza. (29)

El subtipo histológico reportado con mayor frecuencia es el acral lentiginoso con el 54.2% del total de melanomas incluidos en este estudio, seguido por el lentigo maligno melanoma con 18.8%, el melanoma de extensión superficial con el 16.7% y contrario a lo encontrado en otras series, el nodular con tan sólo el 10.4%. Cabe destacar, que aunque la mayoría de la literatura nacional coincide con nuestras cifras,(29) algunas otras ponen al subtipo nodular como el más frecuente o bien en segundo lugar, esto quizás debido a que la mayoría de los tumores se encuentran en una fase de crecimiento vertical al momento del diagnóstico, y esto puede sobreestimar la prevalencia de este último subtipo. De igual manera, tanto el melanoma acral lentiginoso, como el nodular, son los subtipos histológicos que han demostrado mayor agresividad y potencial para desarrollar metástasis, relacionado por su rápido crecimiento vertical y su capacidad para la angioinvasión y neurotropismo.

Otro dato alarmante encontrado en este estudio es que el 68.75% del total de melanomas incluidos, se clasificaron como invasores, con un índice de Breslow en promedio de 2.77mm, y un 37.5% se reportaron con ulceración. Tanto el índice de Breslow como la ulceración, son de los principales factores pronósticos para un paciente con melanoma, y esto hace necesario el abordaje multidisciplinario, ya que la mayoría de estos presentan ganglios positivos al momento del diagnóstico lo cual disminuye la sobrevida en menos del 50% a 5 años y de estos algunos ya presentan metástasis a distancia con una sobrevida menor al 10%.

Existen otros factores pronósticos también importantes como el número de mitosis reportadas en el estudio histopatológico, la edad, el género masculino, ganglios positivos, metástasis a distancia.

En la actualidad, la detección de ciertas mutaciones también se considera como un factor pronóstico importante tanto para sobrevida como para determinar el éxito de un tratamiento.

En este estudio se describieron las mutaciones encontradas en B-RAF V600E y C-kit, NRAS o se pudo realizar por falta de disponibilidad de material biológico, así como escasez de reactivos para dicha prueba, por lo cual se le dio prioridad a B-RAF y C-kit.

El porcentaje de pacientes con mutación positiva para B-RAF V600E se encontró tan sólo en 3 muestras lo que constituye el 6.25%, 2 en melanomas acrales y una en lentigo maligno melanoma.

Se busca específicamente en el codón V600E debido a que hasta un 80% de las mutaciones de B-RAF se encuentran asentadas en él, y el restante en el V600K. La importancia de la identificación de dicha mutación, radica en el desarrollo y aplicación de nuevas terapias blanco dirigidas contra estas mutaciones puntuales con tasas de éxito muy promisorias.(26)

En lo que respecta a lo encontrado con la inmunomarcación de CD117 (c-kit), se obtuvieron 15 muestras positivas (31.25%), 9 de las cuales fueron en melanomas acrales , 4 en melanomas de extensión superficial, uno nodular y un lentigo maligno melanoma.

Estos resultados confirman lo ya reportado en los pocos estudios realizados en hispanos o asiáticos donde el principal subtipo reportado es el acral lentiginoso y cuya mutación relacionada en a nivel de c-kit al igual que en los melanomas de mucosas. (27,28)

Se estableció la relación entre la mutación positiva de c-kit con el subtipo histológico prevalente en nuestra población mestiza, y de manera contradictoria a lo reportado en otros estudios, con el nivel de agresividad, ya que la mayoría de muestras positivas para c-kit, correspondían a melanomas invasores.

Otro dato importante, es la baja frecuencia de mutaciones en B-RAF en nuestros pacientes, lo cual se puede explicar debido a que esta mutación se relaciona con melanomas de sitios fotoexpuestos de forma intermitente e intensa como el melanoma de extensión superficial, que ocupa los primeros lugares en población caucásica.

9. CONCLUSIONES

Este trabajo constituye uno de los primeros reportes sobre el comportamiento biológico del melanoma en nuestra población.

Si bien el melanoma no es por frecuencia una de las principales neoplasias reportadas en nuestro país, continúa con una mortalidad muy elevada por la poca efectividad de la mayoría de los tratamientos actuales.

La tendencia actual es dejar de clasificar a los melanomas de acuerdo al subtipo histológico en acrales, de extensión superficial, lentigo maligno melanoma o nodular; sino más bien por el tipo de mutación encontrada.

Por eso es importante continuar realizando dichos estudios, y a manera de exhorto, que se realicen en todas las instituciones de referencia a nivel nacional que se encargan de la atención de estos pacientes.

Es de vital importancia continuar con la investigación en ésta área, y que se ratifiquen o en su defecto rectifiquen la prevalencia de dichas mutaciones, ya que gracias a su conocimiento se puede echar mano de la tecnología actualmente en desarrollo como lo son las terapias blanco o bien moléculas encargadas de modular la respuesta inmunológica con la finalidad de mejorar la sobrevida y la calidad de vida de estos pacientes, los cuales desgraciadamente continúan diagnosticándose en etapas tardías de la enfermedad y que son una población que sin lugar a dudas se beneficiaría de esta nueva terapéutica.

Aún y con los avances tecnológicos antes mencionados, a consideración de la autora de esta tesis, el melanoma continúa siendo un misterio en cuanto a patogénesis y vías de progresión tumoral; falta mucho por comprender sobre como contraatacar a este majestuoso y fascinante monstruo.

10. PERSPECTIVAS

Continuar con la investigación institucional, sobre todo en aquellos grandes centros de referencia oncológico, propiciar los medios necesarios para que a todo paciente diagnosticado con melanoma se le realicen determinación de mutaciones tanto en etapas iniciales como en estadios avanzados para comprender un poco más el comportamiento de esta neoplasia y de manera secundaria determinar la aplicabilidad de toda la tecnología farmacéutica actualmente disponible.

El camino por recorrer aún es muy largo, sin embargo con el esfuerzo conjunto se hará más llevadero tanto para personal médico y de investigación como para pacientes y familiares.

El desarrollo de vías genéticas específicas para controlar o bloquear mutaciones puntuales es un futuro ya palpable que sólo hay que perfeccionar.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. México: Secretaría de Salud; 2001.
2. NCI CancerNetDatabase
- 3.-Davies H, Bignell Gr, Cox C, et al. Mutations of thr BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-54
- 4.- Wan PT, Gammitt MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations on B-RAF. *Cell* 2004; 116:855-67
5. Kalter Dc, Goldberg LH, Rosen T. Darkly pigmented lesions in dark skinned patients. *J DermatolSurgOncol* 1984;10:876-881.
6. Halder RM, Ara CJ. Skin cancer and photoaging in ethnic skin. *DermatolClin* 2003;21:725-732.
- 7.- Bradford PT, Goldstein AM, McMaster Mc, et al. Acral lentiginous melanoma; incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol* 2009;145 (4) ; 427-434
8. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(24):1878-1880.
9. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med.* 2008;5(6):e120.
10. Muchemwa FC, Ma D, Inoue Y, et al. Constitutive activation of the phosphatidylinositol 3 kinase signaling pathway in acral lentiginous melanoma. *Br J Dermatol.* 2008;158(2):411-413.

11. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, et al. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res.* 2000;60(7):1968-1973. 8.-Tawbi H, Nimmagadda N, et al. Targeted therapy in melanoma. *Biologics: targets and therapy* 2009;3 475-484

12.-Martorell-Catalayud A; Requena C, Botello-Estrada R, et al. Novedades en biología molecular y su aplicación en el diagnóstico y el tratamiento del melanoma. *ActasDermosif* 2009; 100(supl 1):52-65

13.-Mackie RM, Hauschild A, Eggermont AMM, et al. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology* 2009; 20 (Supp 6): vi1-vi7,

14.-Miller Arlo J, Martin C, Mihm Jr. Mechanism of disease Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355:51-65.

15.- Singh M, Lin J., Hocker TL, Tsao H. Genetics of melanoma tumorigenesis. *British Assoc of Derm* 2008; 158:pp15-21

16.-Ghosh P, Farber D, Chin L. Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol.* 2009; 1;4(2):131.

17.-Rother J, Jones D. Molecular markers of tumor progression in melanoma. *Curr Genomics* 2009; 10: 231-239

18.- Fei Su, Viros A, Milagre C, et al. Ras mutations in cutaneous Squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012. Vol 366 no 3.

19. Karam O, Toussaint C, Domínguez C, Vega M. Características clínicas e histopatológicas del melanoma maligno en el Hospital "Dr. Manuel Gea González". Gac Méd Mex. 2008 Vol 44 no 3
20. Delgadillo Grajeda Angel. "Identificación de la mutación V600E del gen B-RAF en melanoma acral lentiginoso en individuos mexicanos", Tesis para obtener grado de maestro en ciencias en investigación clínica. Instituto Politécnico Nacional Escuela Superior de Medicina, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación.
- 21.- Singh M, Lin J, Hocker TL, et al. Genetics of melanoma tumorigenesis. British J of Dermatology 2008; 158,pp15-21
- 22-Hoos A, Eggermont AM, Janetzki S, et al. Improved endpoint for cancer immunotherapy trials. J Natl Cancer Inst. 2010; 102: 1388-97
- 23- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus Dacarbazinepor previously untreated metastatic melanoma. N Engl J Med 2011; 10: 1056
- 24.-Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med 2011; 364:2507-16
- 25.-Melanoma,Guidelines 2012, National Comprehensive Cancer Network
- 26.- Garbe, Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects, *The Oncologist* 2011 ; 16:5-24
- 27.- Gutierrez Vidrio, Confrontando al melanoma en el siglo XXI, Med Cutan Iber Lat Am 2007;35(1):3-13
- 28.- Sekulik, Malignant Melanoma in the 21st Century:The Emerging Molecular Landscape, Mayo Clinic 2008

(47)

29.- Herrera, melanoma en México, Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas 2010;15(3):161-164

12.ANEXOS

ANEXO 1.TABLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

BIOPSIA	SEXO	EDAD	ORIGEN	TOPOGRAFIA	EVOLUCION	SUBTIPO	BRESLO
319-07	FEM	52	DF	Plantar izq	2 años	acral invasor	3.9mm
365-07	fem	85	DF	talón der	1 año	acral invasor	2.5mm
470-07	masc	54	Gto	3er dedo mano	1 año	acral invasor	5.3mm
620-07	fem	43	df	talón der	3 años	acral invasor	1.7mm
636-07	masc	49	df	maleolo int	10 años	acral lentiginoso	in situ
957-07	masc	58	df	pierna tercio inf	30 años	mes	in situ
1060-07	fem	74	df	talón der	1 año	acral invasor	4.7mm
347-08	masc	42	df	tercio sup pierna	1 año	mes	0.4mm
609-08	FEM	10	df	ungueal		acral	in situ
668-08	masc	63	df	inguinal	7 meses	mes nodular invasor	3.9mm
978-08	fem	38	df	tobillo	6 meses	acral invasor	2.7mm
1041-08	masc	51	oax	dedo indice	2 meses	acral invasor	4.6mm
94-09	fem	26	edo mex	dorso pie	1 año	acral invasor	3.10mn
51-09	fem	74	edo mex	cara infraorb	8 mes	lmm focalmente invasor	0.25mn
230-09	masc	47	df	dedo pie	1a6m	acral invasor	3mm
303-09	masc	14	df	uña pie	11 años	acral	in situ
283-09	fem	37	df	cara parotida	nac 8 años	lmm spitzoide focal inv	0.35mn
373-09	fem	76	edo mex	antebrazo	1año	nodular	1.55mn
530-09	masc	67	df	lumbar	1 año	mes	in situ
599-09	fem	84	df	malar izq	8 años	Lmm	in situ
641-09	fem	80	df	malar izq	8 años	LMM	in situ
642-09	masc	53	df	nariz	6 años	LMM	in situ
730-09	fem	59	?	pierna	2 meses	mes focal invasor	0.3mm
1134-09	masc	46	df	uña mano	1 mes	acral focal invasor	0.3mm
357-10	fem	58	gto	nariz	2 años	LMM	in situ
586-10	masc	64	df	frontotemp	8 meses	nodular inv	4mm
643-10	fem	46	chis	Plantar izq	2 años	acral invasor	0.8mm
857-10	masc	59	df	Plantar izq	4 años	acral invasor	3.3 mm
874-10	fem	45	df	cara parietal	6 meses	nodular invasor	3.5mm
1101-10	fem	45	gro	mandibula	1a6m	LMM invasor	0.3mm
937-10	fem	2	chis	mejilla	1a7m	LMM invasor	12mm
300-11	masc	38	df	Plantar izq	nac 1 año	acral invasor	6.5mm
339-11	fem	42	oax	pierna	nac 2 meses	nodular invasor	3.6mm
453-11	fem	47	edo mex	mama izq	nac 2años	mes invasor	0.5mm

469-11	fem	98	oax	palma der	1 año	acral invasor	30 mm
514-11	masc	68	df	Plantar izq	6 meses	acral invasor	4mm
642-11	masc	89	oax	Plantar izq	2 meses	acral invasor	1.9mm
690-11	masc	68	df	escapula	4 meses	nodular invasor	4.5mm
803-11	masc	53	edo mex	dedo pie der	8 meses	acral invasor	2.2mm
894-11	fem	55	gro	uña mano	5 años	acral invasor	0.48mm
949-11	masc	55	hgo	plantar der	8 años	acral invasor	2.9mm
1036-11	fem	58	df	frontemp der	nac 1 año	LMM invasor	2.2mm
1275-11	fem	64	df	Plantar izq	4 meses	acral invasor	2mm
139-12	fem	42	df	dedo mano	6 meses	acral invasor	1.8mm
166-12	masc	42	df	hombro der	5 años	mes invasor	0.8mm
167-12	masc	42	df	torax ant	?	mes invasor	1.3mm
328-12	fem	71	df	plantar der	6 meses	acral invasor	2.3mm
358-12	fem	86	df	tobillo der	2 meses	acral invasor	2.8mm

ANEXO 2. RESULTADOS DE CD117 (C-KIT)

CASO	CD117 (CKIT)	% células neoplásicas	Intensidad	Predominio de positividad
319-07	POS	20	1+	PROFUNDIDAD
365-07	POS	10	2+	CENTRO
470-07	POS	40	2+	PROFUNDIDAD
620-07	POS	50	2+	PROFUNDIDAD
636-07	NEG	0	0	0
957-07	POS	20	2+	CENTRO
1060-07	POS	30	2+	UNIÓN D/E
347-08	NEG	0	0	0
609-08	NEG	0	0	0
668-08	POS	20	1+	PROFUNDIDAD
978-08	NEG	0	0	0
1041-08	NEG	0	0	0
64-09	NEG	0	0	0
51-09	NEG	0	0	0
230-09	POS	70	3+	UNIÓN D/E
303-09	NEG	0	0	0
373-09	NEG	0	0	0
530-09	POS	20	1+	PROFUNDIDAD
599-09	NEG	0	0	0
642-09	NEG	0	0	0
641-09	NEG	0	0	0
730-09	NEG	0	0	0
1134-09	POS	30	1+	PROFUNDIDAD
357-10	POS	50	2+	CENTRO
506-10	NEG	0	0	0
643-10	POS	20	2+	CENTRO
857-10	NEG	0	0	0
874-10	NEG	0	0	0

1101-10	NEG	0	0	0
937-10	NEG	0	0	0
300-11	NEG	0	0	0
339-11	NEG	0	0	0
453-11	POS	20	3+	UNIÓN D/E
469-11	NEG	0	0	0
514-11	POS	30	2+	PROFUNDIDAD
642-11	NEG	0	0	0
690-11	NEG	0	0	0
894-11	NEG	0	0	0
949-11	NEG	0	0	0
1036-11	NEG	0	0	0
1275-11	NEG	0	0	0
139-12	NEG	0	0	0
166-12	POS	20	1+	CENTRO
167-12	NEG	0	0	0
328-12	NEG	0	0	0
358-12	NEG	0	0	0

ANEXO 3

SUBTIPO	Frecuencia del subtipo		C-KIT	ULCERACION	BRESLOW	CLARK	MITOSIS
	Abs	%					
LMM	4	8.32	1	-	in situ	-	-
LMM invasor	3	6.25	0	1	0.3 - 12	II a IV-V	-
LMM focalmente invasor	1	2.08	0	-	0.25	-	-
LMM spitzoide focal invasor	1	2.08	0	-	0.35	-	-
Acral	2	4.16	0	-	in situ	-	-
Acral focal invasor	1	2.08	1	1	0.3	II	-
Acral invasor	22	45.83	8	13	0.48 - 30	IV	0 a 12
Acral lentiginoso	1	2.08	0	-	in situ	-	-
Mes	3	6.25	2	-	in situ - 0.4	II	-
Mes invasor	3	6.25	2	-	0.5 -1.3	III	1 a 2
Mes focal invasor	1	2.08	0	-	0.25	-	-
Mes nodular invasor	1	2.08	0	-	3.9	V	2 a 5
Nodular	1	2.08	0	-	1.55	-	-
Nodular invasor	4	8.32	1	3	3.5 - 4.5	IV	3 a 4

ANEXO 4

Base de datos de BRAF					
VITA-ID	Código de Ingreso	Resultado	Secuencia	[] ng/μL	260/280
BRAF-001	1134-09	Normal	GTG	142	2.07
BRAF-002	230-09	Normal	GTG	174	2.04
BRAF-003	373-09	Normal	GTG	13	1.83
BRAF-004	283-09	Normal	GTG	30	2.4
BRAF-005	94-09	Normal	GTG	25	2.5
BRAF-006	1060-07	Normal	GTG	58	2
BRAF-007	620-07	Normal	GTG	67	2.16
BRAF-008	319-07			43	2.3
BRAF-009	470-07	Normal	GTG	70	2.18
BRAF-010	636-07	Normal	GTG	48	2.23
BRAF-011	641-09	Normal	GTG	77	2.17
BRAF-012	957-07	Normal	GTG	24	1.81
BRAF-013	642-09	Normal	GTG	122	2.13
BRAF-014	365-07	Normal	GTG	275	1.96
BRAF-015	303-09			45	1.78
BRAF-016	599-09	Normal	GTG	33	2.5
BRAF-017	530-09	Normal	GTG	47	2.26
BRAF-018	51-09	Normal	GTG	78	2.11
BRAF-019	730-09			20	2.7
BRAF-020	1041-08	Normal	GTG	166	2.1
BRAF-021	668-08	Normal	GTG	214	2.07
BRAF-022	609-08	Normal	GTG	64	2.23
BRAF-023	347-08	Normal	GTG	32	2.51
BRAF-024	978-08	Normal	GTG	136	2.01
BRAF-025	300-11	Normal	GTG	710	1.73
BRAF-026	642-11	Normal	GTG	440	2.05
BRAF-027	339-11	Normal	GTG	123	2.08
BRAF-028	690-11	Normal	GTG	231	2.07
BRAF-029	453-11			10	6.51
BRAF-030	449-11	Normal	GTG	576	2.01
BRAF-031	803-11	Normal	GTG	273	2.06
BRAF-032	1275-11	Normal	GTG	165	2.03
BRAF-033	1036-11	Normal	GTG	242	2.05

BRAF-034	894-11	Normal	GTG	246	2.08
BRAF-035	358-12	Normal	GTG	800	1.95
BRAF-036	166-12	Normal	GTG	146	2.09
BRAF-037	328-12	Normal	GTG	1177	1.99
BRAF-038	139-12	Normal	GTG	356	2.06
BRAF-039	167-12	Normal	GTG	88	2.16
BRAF-040	643-10	mutado	GAG	205	2.01
BRAF-041	1101-10	Normal	GTG	30	2.45
BRAF-042	857-10	mutado	GAG	238	2.03
BRAF-043	586-10	Normal	GTG	37	2.32
BRAF-044	437-10	mutado	GAG	44	2.04
BRAF-045	357-10	Normal	GTG	97	2.13
BRAF-046	874-10	Normal	GTG	197	1.95
BRAF-047	469-11	Normal	GTG	234	2.04
BRAF-048	514-11	Normal	GTG	176	2.15