



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

PROGRAMA: PATOLOGÍA DE LOS TUMORES HUMANOS (CÓDIGO: 285B)

**ESTADO MUTACIONAL DEL ONCOGÉN N-RAS EN
MELANOMA CUTÁNEO COMO FACTOR
PRONÓSTICO. ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO.**

PRESENTADA POR: PAOLA FERNANDA LARA VALENCIA

DIRIGIDA POR EL DOCTOR: CARLOS MONTEAGUDO CASTRO

VALENCIA, 2015



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

El trabajo titulado:

“ESTADO MUTACIONAL DEL ONCOGÉN N-RAS EN MELANOMA CUTÁNEO COMO FACTOR PRONÓSTICO. ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO”,

que se presenta en esta memoria, ha sido realizado por la licenciada en Medicina y Cirugía Dña. Paola Fernanda Lara Valencia bajo mi dirección.

Dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL**.

Y para que así conste a los efectos oportunos, realizo esta declaración en Valencia a 27 de octubre de 2015.

Fdo: Carlos Monteagudo Castro
Catedrático de Anatomía Patológica,
Universitat de València

«Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro».

Santiago Ramón y Cajal
(1852-1934)

A mis padres
A mi esposo

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que de una u otra forma han ayudado a que esta tesis sea concluida, y es el momento de agradecerles.

En primer lugar, mi más profundo y sincero agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Carlos Monteagudo. Carlos, muchas gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, por creer y confiar en mí, por hacer parte y ayudar a cumplir una de mis metas. Para ti mi mayor admiración y respeto.

Al Dr. Ramón González Manzano, por poner la primera piedra en mi aprendizaje en la realización de técnicas de biología molecular. Gracias Ramón por enseñarme a hacer la extracción del ADN.

A Lara Navarro. Muchas gracias por “sumergirme intensivamente” en el mundo de la biología molecular. Gracias por tu inmensa generosidad a la hora de dedicarme tanto tiempo.

A mi compañero de trabajo José Fernández, quien ha apoyado mi proyecto desde el primer día que se lo comenté. Gracias José por permitir organizar mis horarios y adaptarte a ellos, han sido muchos meses “pidiéndote cambios de horario”.

A Laura Martínez. Por las tantas tardes trabajando conmigo las técnicas de inmunohistoquímica.

A Iván Arribas, por el análisis estadístico de todos los casos del estudio.

No podía dejar de agradecer a Estela Carrasco y Merce Escolano. Chicas, es un gusto trabajar con vosotras, gracias por estar pendientes de mi durante todo este período y gracias por siempre decirme, ¡Si! cuando os pedía “un corte más del caso”.

A mi gran amiga Adriana Aristizabal. Nanita, muchas gracias por escucharme, apoyarme, por tener siempre una palabra de ánimo en el momentos que me hacía falta.

A mi familia, en especial a mis padres y hermano. Gracias a vosotros estoy aquí. Muchas gracias por estar siempre conmigo, por vivir mis proyectos como si fueran vuestros, por animarme siempre a seguir adelante. Aunque estamos muy lejos físicamente, os siento conmigo en cada momento. Vosotros sois el motor de mi vida.

A Enrique. Gracias por ser parte de mi vida, por compartir cada una de mis aventuras y como no podía ser menos, esta tesis. Gracias por no dejarme abatir por las dificultades que se han presentado durante este período, por las muchas risas, por las largas noches de tablas y gráficos, por tu incondicionalidad y sobre todo, por cuidarme y amarme.

¡A todos eternamente agradecida!

ÍNDICE

ÍNDICE	11
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ABREVIATURAS	19
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL ESTUDIO DEL MELANOMA	23
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA	26
1.2.1. Incidencia y Mortalidad	26
1.3. FACTORES DE RIESGO	27
1.3.1. Factores de riesgo intrínsecos	28
1.3.1.1. Edad y sexo	28
1.3.1.2. Fototipo de piel.....	28
1.3.1.3. Nevus.....	30
1.3.1.4. Historia familiar de melanoma	30
1.3.2. Factores de riesgo extrínsecos.....	31
1.3.2.1 Historia social.....	31
1.3.2.2. Exposición a la luz ultravioleta	31
1.3.2.3. Fármacos	33
1.3.2.4. Exposición a químicos.....	33
1.3.2.5. Factores hormonales	33
1.4. PATOGÉNESIS	34
1.5. CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA	34
1.6. FACTORES PRONÓSTICOS DEL MELANOMA CUTÁNEO PRIMARIO	37
1.6.1. Índice de Breslow	38
1.6.2. Índice Mitótico.....	38
1.6.3. Ulceración.....	38
1.6.4. Linfocitos intratumorales	39
1.6.5. Fase de crecimiento tumoral	39
1.6.6. Regresión	40
1.6.7. Subtipo histológico	40
1.6.8. Invasión linfovascular	41
1.6.9. Invasión perineural.....	41
1.6.10. Metástasis.....	41
1.7. GENES, MUTACIONES Y MECANISMOS MOLECULARES	42

1.7.1. Gen CDKN2A.....	42
1.7.2. Gen CDK4A/CCND1	44
1.7.3. Gen MCR 1	45
1.7.4. Mutaciones somáticas en melanoma: Vía MAP Kinasas	46
1.7.4.1. Mutaciones activadoras de los genes RAS	47
1.8. PD-1/PD-L1.....	50
2. OBJETIVOS.....	53
2.1 Objetivos Generales	57
2.2 Objetivos Específicos	57
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1. ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO.....	61
3.1.1. Estudio Clínico.....	61
3.1.2. Estudio histológico.....	62
3.1.3. Estudio Inmunohistoquímico	64
3.1.3.1. N-RAS (Q61R).....	68
3.1.3.2. PD-1	68
3.1.3.3. PD-L1	68
3.2. BIOLOGÍA MOLECULAR: ESTADO MUTACIONAL DE N-RAS.....	69
3.2.1. Protocolo extracción de DNA a partir de tejido fijado en formol e incluido en parafina.....	69
3.2.2. PCR y Secuenciación N-RAS	73
4. RESULTADOS.....	85
4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS CASOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	87
4.2 ESTUDIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR	97
4.2.1. Análisis del estado mutacional del oncogén N-RAS.....	97
4.2.1.1. Descripción de las características clínico-patológicas de los melanomas que presentaron mutación N-RAS	102
4.2.1.2. Correlación del estado mutacional de N-RAS con los parámetros clínico-patológicos	104
4.2.1.3. Estudio estadístico de la asociación del estado mutacional de N-RAS con las distintas variables clinico-patológicas y de evolución clínica.	108
4.2.2.4. Estudio estadístico de la asociación del estado mutacional de NRAS con la supervivencia y los intervalos libres de enfermedad local, regional y a distancia.....	115
4.3.1 N-RAS (Q61R):	116
4.3.2. PD-L1.....	118
4.3.2.1 Correlación de la inmunotinción para PD-L1 con la evolución clínica	121
4.3.2.2. Estudio de la asociación de la inmunotinción para PD-L1 con el tiempo de supervivencia y los intervalos libres de enfermedad local, regional y a distancia.....	123
4.3.3. PD-1	125
4.3.3.1. Correlación de la inmunotinción para PD-1 con la evolución clínica	125

4.3.3.2. Estudio de la asociación de la inmunotinción para PD-1 con el tiempo de supervivencia y los intervalos libres de enfermedad local, regional y a distancia.....	129
4.3.4. Estudio de la asociación de la inmunotinción para PD-L1 y PD-1 con el estado mutacional de N-RAS	130
4.3.5. Estudio del valor predictivo mediante regresión logística para el desarrollo de metástasis a distancia:	130
4.3.6. Estudio del valor predictivo mediante el área bajo la curva ROC para el desarrollo de metástasis a distancia:	130
5. DESARROLLO ARGUMENTAL	133
6. CONCLUSIONES	141
7. BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los anticuerpos utilizados (NRAS Q61R, PD-L1, PD-1)	66
Tabla 2. Mezcla de reacción para una PCR de 25 µL	75
Tabla 3. Condiciones para las amplificaciones de exones 2 y 3	75
Tabla 4. Secuenciación de primers para amplificación de N-RAS Codones 12 y 61	76
Tabla 5. Componentes de Big Dye por cada reacción de 10 µL	77
Tabla 6. Temperaturas y tiempos empleados en la reacción de secuenciación.	78
Tabla 7. Datos clínicos de la muestra.	89
Tabla 8. Características histológicas I.	93
Tabla 9. Características histológicas II.	94
Tabla 10. Variables de evolución clínica de la muestra	96
Tabla 11. Tiempo de supervivencia específica de tumor e intervalo libre de enfermedad	97
Tabla 12. Localización de melanoma primario y características histológicas de los casos que presentan mutación N-RAS	104
Tabla 13. Mediana de edad por estado mutacional N-RAS	106
Tabla 14. Correlación de la presencia o ausencia de la mutación N-RAS con las variables histológicas y clínicas	109
Tabla 15. Correlación de la inmunotinción PD-L1 con metástasis en tránsito	121
Tabla 16. Correlación de la inmunotinción PD-L1 con el desarrollo de metástasis ganglionares ...	121
Tabla 17. Correlación de la inmunotinción de PD-L1 con la recaída tumoral	122
Tabla 18. Correlación de la inmunotinción de PD-L1 con el desarrollo de metástasis a distancia .	122
Tabla 19. Correlación de la inmunotinción PD-L1 con éxitus	123
Tabla 20. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con recaída tumoral	127
Tabla 21. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con metástasis en tránsito	127
Tabla 22. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con metástasis ganglionar	128
Tabla 23. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con metástasis a distancia	128
Tabla 24. Correlación de la inmunotinción PD-1 y éxitus	129
Tabla 25. Correlación de la mutación N-RAS con la inmunotinción para PD-L1 y PD-1	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad por melanoma en Europa 2008. Globocan 2008.	27
Figura 2. Fototipos de piel de Fitzpatrick.....	29
Figura 3. Alteraciones genéticas debido a radiación ultravioleta.....	32
Figura 4. Imagen histológica de melanoma de extensión superficial.....	35
Figura 5. Imagen histológica de melanoma nodular	36
Figura 6. Imagen histológica de melanoma melanoma léntigo maligno.....	37
Figura 7. Mecanismos de acción de INK4 y ARF	44
Figura 8. Representación esquemática del gen CDK4	45
Figura 9. Representación esquemática de la vía MAPK	47
Figura 10. Representación esquemática de la vía de mutación N-RAS	49
Figura 11. Vía de señalización PD-1/PD-L1	53
Figura 12. Cuantificación ADN (Nanodrop ND-1000).....	72
Figura 13. Representación esquemática: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR. B. Fases de la PCR. C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación	74
Figura 14. Estudio de secuenciación N-RAS Exón 2 (codones 12 y 13)	79
Figura 15. Estudio de secuenciación N-RAS Exón 3 (codones 60 y 61)	79
Figura 16. Preparación del gel de agarosa.....	81
Figura 17. Imagen de la PCR. N-RAS codón 12.....	82
Figura 18. Distribución de la muestra por sexo.....	87
Figura 19. Distribución de la muestra por edad.	88
Figura 20. Distribución de la muestra por sitio anatómico	88
Figura 21. Distribución de la muestra por índice de Breslow	90
Figura 22. Distribución de la muestra por presencia o ausencia de invasión.....	90
Figura 23. Distribución de la muestra por tipo histológico	91
Figura 24. Distribución de la muestra por ulceración	91
Figura 25. Distribución de la muestra por invasión vascular.	92
Figura 26. Distribución de la muestra por invasión perineural	92
Figura 27. Distribución de la muestra por regresión	93
Figura 28. Distribución de la muestra por lesión melanocítica asociada	93
Figura 29. Distribución de la muestra por recaída local.....	95
Figura 30. Distribución de la muestra por sitio de metástasis a distancia.....	95
Figura 31. Distribución de la muestra por estado mutacional N-RAS	97
Figura 32. Distribución de la muestra por tipo de mutación N-RAS	98
Figura 33. Resultado de la secuenciación. Mutación N-RAS p.Q61R.....	99
Figura 34. Imagen histológica de melanoma con mutación N-RAS p.Q61R.....	99
Figura 35. Resultado de la secuencia. Mutación N-RAS p.Q61K	100
Figura 36. Imagen histológica de melanoma con mutación N-RAS p.Q61K	100
Figura 37. Resultado de la secuenciación mutación N-RAS p.Q61L	101
Figura 38. Imagen histológica de melanoma con mutación N-RAS p.Q61L.....	101
Figura 39. Resultado de la secuenciación mutación N-RAS p.G12D.....	102
Figura 40. Imagen histológica de melanoma con mutación N-RAS p.G12D	102
Figura 41. Distribución de la mutación N-RAS por sitio anatómico	103
Figura 42. Distribución de la mutación N-RAS por tipo histológico.....	103

Figura 43. Prevalencia de la mutación N-RAS por sexo.....	105
Figura 44. Distribución del tipo de mutación N-RAS por sexo.	105
Figura 45. Prevalencia de la mutación N-RAS por edad.	106
Figura 46. Distribución del tipo histológico en los casos mutados	107
Figura 47. Prevalencia de la mutación N-RAS por tipo histológico.	107
Figura 48. Distribución de la mutación N-RAS en melanoma in situ e invasores	108
Figura 49. Prevalencia de la mutación N-RAS en melanomas in situ e invasores.....	108
Figura 50. Prevalencia de la mutación N-RAS por tipo celular	110
Figura 51. Prevalencia de la mutación N-RAS por localización.....	110
Figura 52. Prevalencia de la mutación N-RAS por índice de Breslow.	111
Figura 53. Prevalencia de la mutación N-RAS por ulceración	111
Figura 54. Prevalencia de la mutación N-RAS por mitosis.	112
Figura 55. Prevalencia de la mutación N-RAS por invasión vascular.	112
Figura 56. Prevalencia de la mutación N-RAS por invasión perineural	112
Figura 57. Prevalencia de la mutación N-RAS por infiltrado linfocitario	113
Figura 58. Prevalencia de la mutación N-RAS por regresión.	113
Figura 59. Prevalencia de la mutación N-RAS por elastosis solar.....	114
Figura 60. Prevalencia de la mutación N-RAS por lesión melanocítica asociada	114
Figura 61. Tiempo de supervivencia específica de tumor.....	115
Figura 62. Intervalo libre de metástasis.....	115
Figura 63. Expresión inmunohistoquímica N-RAS intensidad +++	117
Figura 64. Expresión inmunohistoquímica N-RAS intensidad +.....	117
Figura 65. Inmunotinción PD-L1 citoplasmático/membranosa +	118
Figura 66. Inmunotinción PD-L1 citoplasmático/membranosa ++.....	119
Figura 67. Inmunotinción PD-L1 citoplasmático/membranosa +++.....	119
Figura 68. Inmunotinción PD-L1 nuclear ++.....	120
Figura 69. Inmunotinción PD-L1 nuclear +++.....	120
Figura 70. Imagen histológica para inmunotinción de PD-1. 10x.....	126
Figura 71. Imagen histológica para inmunotinción de PD-1. 20x.....	126

ABREVIATURAS

a.a: aminoácidos

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AKT: proteína quinasa B

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

α -MSH: Melanocortina α

APC: célula presentadora de antígenos

Arg: Aminoácido Arginina

Asp: Aminoácido Ácido Áspártico

BRAF: protooncogen de la familia RAF

CCND1: gen que codifica la ciclina D1

CDK4: Quinasa dependiente de ciclina

CDKN2A: Inhibidor de la quinasa ciclina dependiente 2A

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

CPH: complejo mayor de histocompatibilidad

Cys: Aminoácido Cisteína

dNTP: desoxirribonucleotidos

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos

Gln: Aminoácido Glutamina.

HDM2: regulador negativo de p53

His: Aminoácido Histidina

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleucina

Ile: Aminoácido Isoleucina

INK4A: Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CDK4)

ITIM: Inhibidor del inmuno-receptor basado en tirosina

MAPK: Proteínas activadas por mitógenos

MC1R: Receptor de la melanocortina-1

MEK: Quinasa MAPK/ERK

N-RAS: gen de la familia RAS

P16^{INK4A}: Proteína inhibidora de CDK4

P14^{ARF}: Proteína inhibidora de ARF

P53: proteína supresora de tumores

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1

PD-L1: Ligando de PD-1

PI3K: Quinasa fosfoinositida-3

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: Transcripción inversa – Reacción en cadena de la polimerasa

SEER: Registro de Epidemiología de la Vigilancia y Resultados Finales

TBE: Tampón tris-borato-EDTA

TBS: Tampón fosfato salino

TCR: Receptor de linfocitos T

Thr: Aminoácido Treonina

TIL: Infiltrado linfocitario asociado al tumor

Tpr: Aminoácido Triptófano

TNM: (Tumor – Nodes – Metastases) Tumores – ganglios – metástasis

UV: Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL ESTUDIO DEL MELANOMA

Aunque el melanoma no es una enfermedad nueva, la evidencia de su incidencia en la antigüedad es más bien escasa. Sin embargo, un ejemplo se encuentra en un examen de nueve momias Incas peruanas en 1960, por radiocarbono data de aproximadamente 2400 años, estas mostraron signos aparentes de melanoma: masas melanóticas en la piel y metástasis difusas a los huesos. ¹

Entre 1650-1760, la literatura médica europea, incluía la labor de Highmore (1651), Bonet (1651), y Henrici y Nothnagel (1757), haciendo numerosas referencias a los "tumores negros fatales con metástasis y el líquido negro en el cuerpo". En la literatura médica occidental se le atribuye al cirujano escocés John Hunter, la primera extirpación quirúrgica de un melanoma. En 1787, operó y eliminó con éxito un melanoma recurrente de la mandíbula de un hombre de 35 años de edad, denominando a este "tumor fungoide". ² A pesar de que no estaba claro que Hunter sabía lo que estaba tratando con el tumor conservado, fue diagnosticado más tarde como un melanoma por el patólogo Bodenham en 1968; aún se encuentra en el Hunterian Museum en Lincoln Inn Fields en Londres, Reino Unido. ³

René Laennec, fue el primero en darse cuenta de que el melanoma es una enfermedad distinta y no relacionada con los depósitos de carbón negro que encontraba típicamente en los pulmones de los pacientes tras autopsia. ⁴ En una conferencia, dada en París en 1804, y publicada más tarde en 1806, acuñó el término *melanosis* para describir estos tumores. Su publicación sobre el melanoma dio lugar a una ruptura con su mentor, el Baron Dupuytren (ex cirujano de Napoleón Bonaparte) quien afirmó que su obra no se había acreditado suficientemente ⁵. Otro estudiante de Dupuytren, Jean Cruveilhier en su libro *Anatomie pathologique du Corps Humain* (publicado entre 1829 a 1842) fue el primero en describir los melanomas de la mano, el pie y la vulva. ⁵

Uno de los primeros informes exhaustivos e interesantes sobre la etiología y la progresión de "melanosis" fue dada en 1820 por el Dr. William Norris, un médico general de Stourbridge, Reino Unido, bajo la descripción de "enfermedad fungoide". El caso correspondía a un hombre de 59 años a quien operó en febrero de 1817 por un tumor de la pared abdominal, el que se había desarrollado de un lunar preexistente. "Seis meses después el tumor reapareció con un color marrón oscuro, se ulceró y segregaba un líquido maloliente. Poco tiempo después aparecieron nódulos rodeando al tumor primario y los ganglios inguinales se encontraban tumefactos". La evolución del paciente fue fatal y el Dr. Norris practicó la autopsia, encontrando metástasis en el esternón, en los pulmones y en el abdomen, lugares anatómicos donde encontró "miles y miles" de manchas color alquitrán. Este caso fue publicado en "The Edinburg Medical and Surgical Journal" en el año 1820.⁶

En 1857, Norris amplió sus observaciones anteriores y describió otros 8 casos de melanoma. A partir de estos, ideó algunos principios generales para la epidemiología del melanoma y el manejo clínico. Fue uno de los primeros en proponer una relación entre los nevus y melanoma y un posible vínculo entre el melanoma y la exposición a factores ambientales (como la contaminación industrial), e hizo la observación de que la mayoría de sus pacientes tenían pelo de color claro y tez pálida. El describió además que los melanomas podían ser pigmentados o amelanóticos y que tenían una tendencia amplia de diseminación a muchos órganos viscerales. El Dr. Norris observó además, que ni los tratamientos quirúrgicos ni médicos eran efectivos una vez que el melanoma fuera ampliamente diseminado. Para controlar la recurrencia, Norris abogó por una amplia extirpación del tumor y la piel circundante no afectada, ya que se pensaba que era más eficaz para prevenir la recidiva del tumor.²

Muchos médicos de la época, entre ellos los doctores Breschet, Fawdington y Carswell, también observaron la incidencia de melanoma en muchas especies de animales, incluyendo caballos, perros y gatos. En 1844, un cirujano británico llamado Samuel Cooper publicó *las primeras líneas de la teoría y la práctica de la cirugía*. En 1840, Cooper reconoció que las etapas avanzadas del melanoma

eran intratables y declaró, "la única oportunidad para el beneficio depende de la eliminación temprana de la enfermedad" una declaración que a día de hoy sigue siendo cierto en gran medida.²

Aunque gran parte de la obra desde el siglo XIX fue fundamental en la definición del melanoma como una enfermedad, los estudios realizados fueron de carácter descriptivo y dieron poco conocimiento de su etiología subyacente. La utilidad de la observación cuidadosa, junto con los métodos cuantitativos rigurosos, resultaron fundamentales en la última parte del siglo XX para definir el pronóstico y el tratamiento del melanoma. En 1966, Wallace Clark ideó una escala estándar para evaluar el pronóstico del melanoma basado en el examen histológico. El sistema llamado nivel de Clark, se refiere a la extensión de la invasión hacia abajo en cinco niveles de la piel y el tejido subcutáneo, cada una más agresiva, las células tumorales invaden en profundidad en la epidermis, la dermis y en último lugar, el tejido celular subcutáneo. Las tasas de supervivencia a 5 años oscilaban entre más del 99% en melanomas Clark nivel I (melanoma *In Situ*) a 55% en los que presentan un melanoma Clark nivel V. En 1969, Clark refutó la anterior suposición generalizada de que todos los melanomas surgieron de nevus; su serie de 209 casos mostró que sólo 20 (9,6%) tuvieron la presencia incuestionable de células névicas.⁷

En 1970, Alexander Breslow observó que el pronóstico del melanoma cutáneo parecía estar en función tanto del tamaño del tumor, del nivel de invasión, con el grosor del tumor, la medida más significativa de tamaño. El espesor de Breslow se definió como la profundidad vertical total del melanoma, midiendo desde la capa granular de la epidermis a la zona de penetración más profunda en la piel. Lesiones nivel Clark II y lesiones menores de 0,76 mm de grosor máximo, se asociaron con un pronóstico más favorable. Estos criterios ayudaron a estratificar a los pacientes a tener o no tener la disección profiláctica de los ganglios linfáticos (actualmente la biopsia del ganglio centinela).⁸ Los trabajos pioneros de Clark y Breslow sigue siendo relevante el día de hoy, el grosor del tumor es un factor pronóstico importante para melanoma, este se encuentra en la versión actual del sistema de estadificación de melanoma (AJCC).⁹

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA

1.2.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD

La incidencia y mortalidad del melanoma maligno cutáneo han aumentado de forma espectacular en las últimas décadas. El incremento anual en las cifras de incidencia varía entre diferentes poblaciones. Desde inicios de los años 60 del siglo pasado se ha detectado un incremento sostenido de la incidencia del melanoma, entre un 3 y un 7% anual, en varios países occidentales.¹⁰ Se calcula que durante el año 2.000 se produjeron en el mundo desarrollado unos 100.000 nuevos casos, lo que representa un 7-8% de todos los cánceres¹¹, aunque las cifras varían de un país a otro¹². Las estimaciones más recientes sugieren una duplicación de la incidencia del melanoma cada 10-20 años¹³. A nivel mundial el melanoma fue, en el año 2002, el 16º y 15º cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres y mujeres, respectivamente, y con una mayor incidencia en Australia, Nueva Zelanda, Norteamérica y Europa.¹⁴ En Estados Unidos, entre los años 2003 y 2007, el melanoma fue el 5º cáncer más frecuente en hombres y el 7º en mujeres.¹⁵

En Europa, se diagnostican aproximadamente 60.000 nuevos casos al año (26.100 en varones y 33.300 en mujeres), lo que representa el 1 % de todos los cánceres. Las cifras de incidencia son ligeramente superiores en mujeres que en varones, 7 y 6 casos por 100.000 personas/año, respectivamente, y cifras aún mayores en el norte que en el sur de Europa.^{16,17} En Europa sigue un claro gradiente norte-sur, de forma que las mayores tasas de incidencia corresponden a los países nórdicos, con 15 casos por 100.000 habitantes y año aproximadamente. Por el contrario, son los países de la cuenca mediterránea los que presentan las tasas más bajas: entre 5 y 7 casos por 100.000 habitantes y año, entre ellos España¹⁸, aunque también en estos países se ha producido un aumento muy importante del número de melanomas en los últimos años (Figura 1).

Según datos publicados por el centro nacional de epidemiología (Instituto de Salud Carlos III), la incidencia anual de melanoma en España se sitúa en una tasa anual ajustada a la población europea de 6,14 en hombres y 7,26 en mujeres por 100.000

habitantes.¹⁹⁻²⁰ En España, en el año 2000 se diagnosticaron 3068 casos nuevos de melanoma y se produjeron 698 muertes a causa de esta enfermedad.²¹

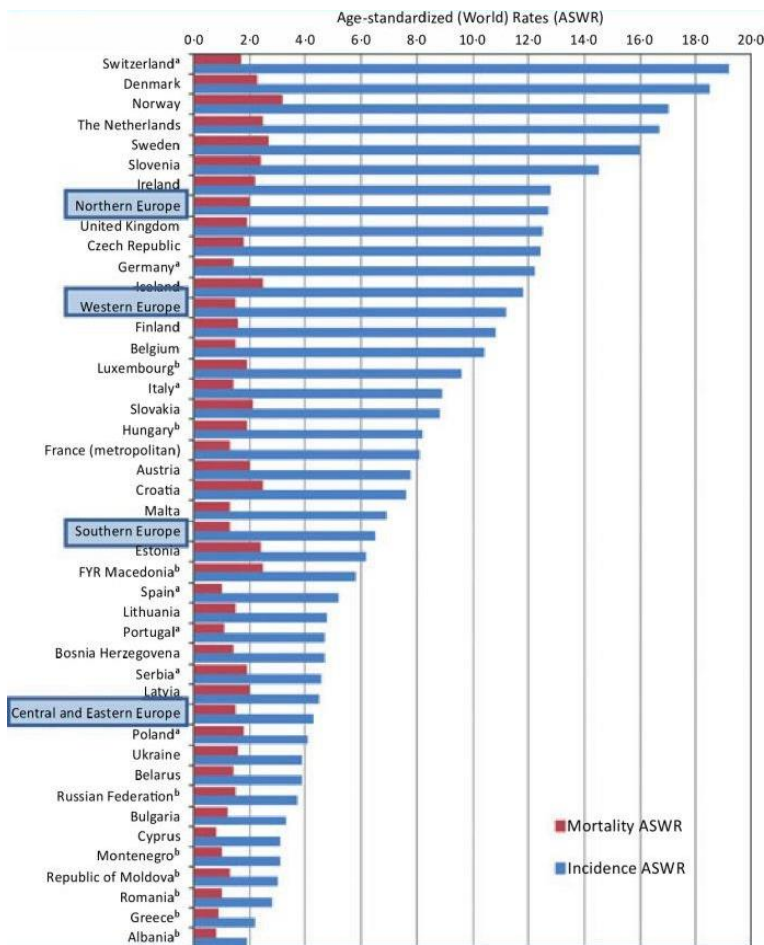


Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad por melanoma en Europa 2008. Globocan 2008

1.3. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo del melanoma incluyen factores intrínsecos (genética y fenotipo) y factores extrínsecos (medioambiente y exposición), aunque los factores intrínsecos son propios de cada paciente y no pueden ser modificados. Por el contrario, los factores extrínsecos, desde los estilos de vida al medio ambiente, pueden ser minimizados, sobre todo en aquellas personas con incremento del riesgo de melanoma por factores intrínsecos. Los factores de mayor riesgo incluyen edad, fototipo de piel, nevus (displásico, nevus gigante congénito o gran número de nevus), exposición continua a la luz ultravioleta, historia familia.²²

1.3.1. FACTORES DE RIESGO INTRÍNSECOS

1.3.1.1. EDAD Y SEXO

El riesgo de melanoma aumenta con la edad, tanto para hombres como para mujeres.²³

En los pacientes con melanoma, la incidencia de desarrollar un segundo melanoma primario es de 5,3% a los 20 años del desarrollo del primer melanoma y también es más alta en los pacientes varones mayores.²⁴ Además, los pacientes con edades más avanzadas presentan con más frecuencia melanoma de tipo léntigo maligno, ocurriendo estos en un 75% en el área de cabeza y cuello.²⁵

En cuanto a sexo, el riesgo en general es mayor en hombres; sin embargo, la incidencia es mayor en las mujeres hasta la edad de 40 años y mayor en los varones, con una proporción de 2: 1 hombre: mujer.²²

La base de datos SEER, muestra la mayor tasa de mortalidad en los hombres de edad avanzada durante los años 1992 a 2007, con una tasa de mortalidad de 30,9 por 100.000 en hombres mayores de 85 años, en contraste con la máxima tasa de mortalidad femenina de 12,4 por 100.000 en las pacientes mayores de 85 años. Los hombres de edad avanzada tienen desproporcionadamente mayor mortalidad por melanoma, con tasas que son más del doble de la tasa de mortalidad femenina al comparar todos los grupos de edad mayores de 55 años.¹⁴

1.3.1.2. Fototipo de piel

Se ha asociado un mayor riesgo de melanoma, en personas que presentan un fototipo de piel específico (fototipo Fitzpatrick), tales como piel pálida, cabello rubio o rojo, pecas y tendencia a broncearse o quemarse fácilmente con el sol.²⁶

Los fototipos cutáneos definidos por Fitzpatrick (figura 2) son los siguientes:

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

Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III	Fototipo IV	Fototipo V	Fototipo VI
Siempre se quema y nunca se broncea.	Casi siempre se quema y a veces se broncea.	A veces se quema y generalmente se broncea.	Raro que se queme y siempre se broncea.	Se quema raramente. Bronceado muy intenso.	Casi nunca se quema.
Ojos y pelo claros. Piel muy blanca.	Ojos azules o pardos. Pelo rubio o pelirrojo. Piel blanca.	Tipo nórdico alpino.	Ojos y pelo oscuros. Piel blanca o un poco tostada.	Piel con un tono marrón.	Razas negras.

Figura 2. Fototipos de piel de Fitzpatrick

El mayor riesgo se encuentra en los pacientes con cabello rojo o tez blanca (fototipo 1), seguido de los que se queman fácilmente, y la alta densidad de pecas.²²

1.3.1.3. NEVUS

Los nevus displásicos son marcadores de mayor riesgo de melanoma, tanto para el individuo como para su familia.²²

La presencia de más de 50 nevus comunes, nevus displásicos, o nevus gigantes, se asocian con la presencia de melanoma. Estudios multicéntricos implican a 5700 pacientes con melanoma apoyaron un mayor riesgo de melanoma en aquellos pacientes que tenían un mayor número de nevus en la totalidad del cuerpo, la presencia de nevus clínicamente atípicos, o la presencia de grandes nevus, independientemente de la latitud.²⁷ Los datos de este estudio mostraron un fuerte aumento del riesgo de melanoma con la presencia de grandes nevus en el cuerpo, y se sugirió que un nevus anormal está asociado a melanomas en sitios del cuerpo intermitentemente expuestos al sol.²⁷

Los nevus congénitos no se encuentran asociados con un mayor riesgo de melanoma;²⁸ sin embargo, los nevus congénitos pigmentados gigantes (que abarca > 5% de superficie corporal) confieren un aumento del riesgo sustancial para el desarrollo de melanoma.²⁹

1.3.1.4. HISTORIA FAMILIAR DE MELANOMA

Los antecedentes familiares de melanoma se han asociado con un incremento del riesgo de presentar melanoma. El riesgo aumenta cuando uno de los padres tiene múltiples melanomas.³⁰ El síndrome familiar de nevus displásicos múltiples y melanoma (FMMM), describe un síndrome en que dos o más familiares de primer grado de consanguinidad tienen múltiples nevus displásicos y una historia de melanoma.³¹ A menudo, estos pacientes portan mutaciones en el gen *CDKN2A* o en vías relacionadas. En familias propensas a presentar nevus displásicos o melanomas seguidas de forma prospectiva, se observó que el riesgo acumulativo de desarrollar melanoma a una edad temprana (antes de los 50 años de edad) era del 48,9%.³²

1.3.2. Factores de riesgo extrínsecos

Se consideran factores externos que están asociados con el riesgo de melanoma. Aspectos de la historia social de un paciente, como estado civil, nivel socioeconómico y ocupación, se ha demostrado que impactan el riesgo de melanoma, aunque el mecanismo para estas interacciones no se conoce bien. El riesgo de exposición ultravioleta es más fácilmente explicado, y se ha estudiado los efectos de la radiación ultravioleta tanto natural como artificial. Así mismo, los medicamentos y las exposiciones químicas pueden influir en el riesgo de melanoma, y nuevos estudios han examinado si los medicamentos pueden desempeñar un papel en la modificación del riesgo de melanoma.

1.3.2.1 HISTORIA SOCIAL

En cuanto a la ocupación de la población afectada por melanoma, se ha observado una asociación con una mayor incidencia de melanoma en quienes trabajan al aire libre, por otro lado, se ha observado que individuos con educación superior presentaban altas tasas de melanoma.^{22,33,34} Un análisis de los registros de cáncer en Inglaterra, Gales y Suecia encontraron que el riesgo ocupacional más alto estaba asociado con los pilotos de líneas aéreas, corredores de finanzas y seguros, contadores profesionales, dentistas, inspectores, y supervisores de transporte, profesiones que comparten un alto nivel de educación.³⁵

1.3.2.2. EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) identifica la radiación solar y ultravioleta como un factor de riesgo ambiental significativo para el melanoma maligno cutáneo (IARC, 1992). En 2009 un grupo de trabajo del IARC clasifica los dispositivos emisores de luz ultravioleta como grupo 1 de carcinogénesis.³⁶ Actualmente se considera la exposición a la radiación ultravioleta como el principal factor etiológico de la aparición de melanoma, siendo este el responsable del 65% de esta neoplasia en el mundo. La exposición intermitente al

sol y las quemaduras solares repetidas son una causa importante en la aparición de melanoma.³⁷⁻³⁸

El melanoma se desarrolla como consecuencia de una acumulación de anomalías genéticas, en general, las mutaciones inducidas en el ADN por la radiación ultravioleta convierten a los mecanismos de reparación del ADN en un importante protector contra el melanoma, que es particularmente problemático para los pacientes con defectos en la reparación del ADN. Estas anomalías promueven la proliferación celular y evitan la vía normal de la apoptosis como respuesta al daño del ADN. Los melanocitos alterados acumulan daños en el ADN, resultando una selección de genes mutados que permiten el crecimiento de vasos sanguíneos, evasión de la respuesta inmune, invasión tumoral y metástasis.

La activación constitutiva de mutaciones en NRAS se produce en el 21% de pacientes con melanoma y las mutaciones de BRAF se producen en el 60-80% de los melanomas (Figura 3).^{39,40,41} Algunos autores han planteado la preocupación de que el cambio climático y el agotamiento del ozono conducirán a aumento de la exposición a radiación solar ultravioleta, que puede correlacionar más con aumentos en cáncer de piel.⁴²

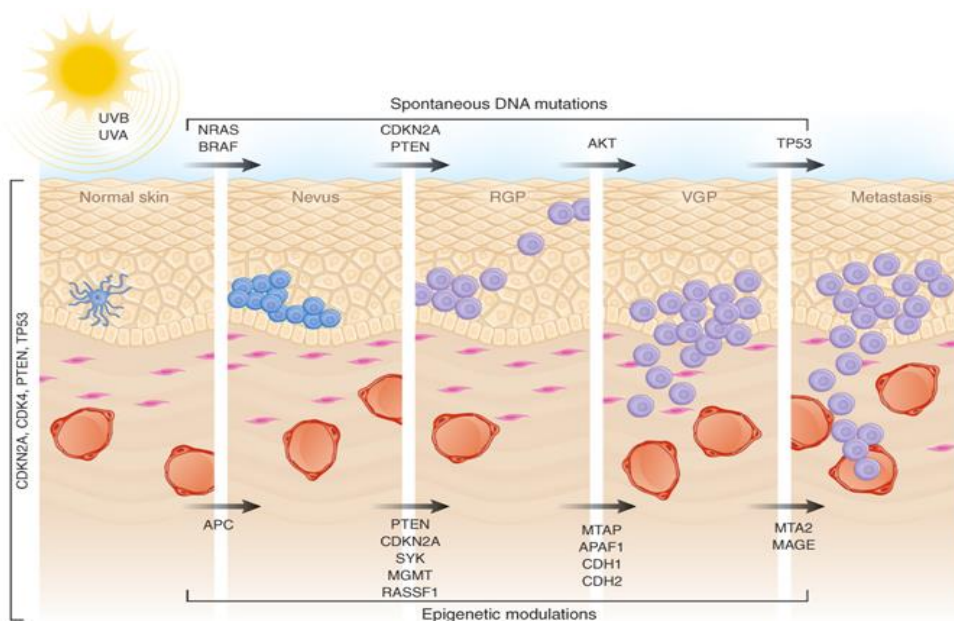


Figura 3. Alteraciones genéticas debido a radiación ultravioleta

1.3.2.3. FÁRMACOS

Algunos autores han demostrado la asociación positiva con el tratamiento con psoralenos, estos pueden incrementar artificialmente el daño inducido por la luz ultravioleta, aumentando significativamente el riesgo por melanoma. Pacientes que han recibido un alto número de tratamientos de fotoquimioterapia oral con metoxalenos y luz ultravioleta han incrementado el riesgo de melanoma y sigue aumentando este riesgo después de pasados varios años.⁴³

La ingesta de otros fármacos, como la levodopa,⁴⁴ algunos beta-bloqueantes, tiazidas y benzodiazepinas, también se han asociado con el desarrollo de melanoma.

1.3.2.4. EXPOSICIÓN A QUÍMICOS

Existe una probable asociación de melanoma con radiación ionizante, así como productos químicos y contaminantes como el arsénico.²² Las exposiciones ocupacionales a productos químicos tales como vinilo, cloruro, bifenilos policlorados, y petroquímicos se han relacionado con un posible mayor riesgo de melanoma, aunque la contribución de estas exposiciones al melanoma, en general, no se ha demostrado el riesgo de forma consistente en los estudios clínicos.⁴⁵

1.3.2.5. FACTORES HORMONALES

Las hormonas sexuales femeninas y el uso de anticonceptivos orales se han puesto en duda con respecto a un potencial aumento del riesgo de melanoma, debido a un ligero riesgo mayor de pacientes con cáncer de mama y presencia de melanoma,⁴⁶ y el hecho de que los estrógenos pueden aumentar el recuento de los melanocitos y causar hiperpigmentación cutánea.

1.4. PATOGÉNESIS

El melanoma se produce como resultado de complejas interacciones de factores genéticos y ambientales. El riesgo individual para el desarrollo de este tumor está determinado por la presencia de mutaciones heredadas o polimorfismos en los genes asociados a melanoma y por la magnitud de la exposición solar aguda o crónica recibida a lo largo de la vida.⁴⁷

Existen varios pasos histológicos en el desarrollo y progresión de este tumor. Inicia en etapas tempranas localizándose en la epidermis, con un crecimiento radial; posteriormente se convierte en un melanoma microinvasor con extensiones microscópicas a la dermis papilar superficial y por último progresa a una fase vertical hacia la dermis reticular e hipodermos, adquiriendo además potencial metastásico.⁴⁸

1.5. CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA

Existen cuatro subtipos clásicos de melanoma,⁴⁹ que en orden decreciente de frecuencia son: el melanoma de extensión superficial, el melanoma nodular, el melanoma léntigo maligno, y el melanoma lentiginoso acral. Asimismo, existen numerosos subtipos poco frecuentes, entre los que cabe destacar el nevus azul celular maligno,⁵⁰ el melanoma desmoplásico,⁵¹ el melanoma nevoide,⁵² melanoma de células en anillo de sello, etc.⁵³ La distinción clínica entre los diferentes subtipos clásicos no siempre es fácil, pero en general, suele estar relacionada con una localización anatómica determinada.

-Melanoma de extensión superficial: Es el tipo más común, con frecuencia aparece como una mácula o placa asimétrica, de bordes irregulares. Es frecuente la presencia de un área de regresión. Clínicamente la lesión progresa como una mácula asimétrica, irregularmente pigmentada con tonos que varían entre azul oscuro, rosa, marrón y negro. Crece lentamente en el transcurso de años y es la forma más frecuente de melanoma en fase de crecimiento radial. El melanoma de

extensión superficial se asocia a exposición solar intermitente y se presenta con mayor frecuencia en personas jóvenes entre los 30 y los 50 años.⁵⁴

Histológicamente, se caracterizan por una proliferación de melanocitos atípicos, formando nidos o tecas que se extienden de forma aislada dentro de la epidermis con un patrón denominado pagetoide. El componente infiltrativo suele estar formando nidos o masas sólidas que infiltran difusamente la dermis sin presentar signos de maduración en las capas profundas de la dermis (Figura 4). Las células neoplásicas pueden ser epitelioides o más raramente nevoides.⁵⁵

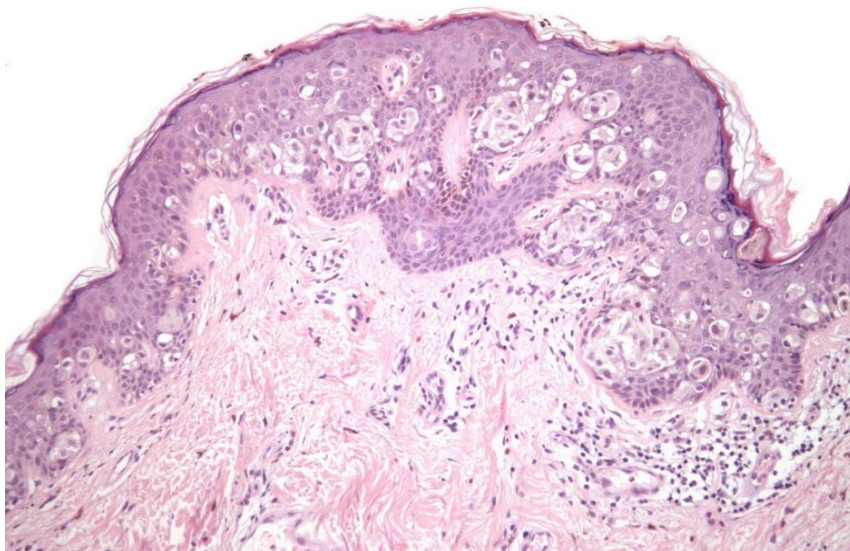


Figura 4. Imagen histológica de melanoma de extensión superficial

-Melanoma Nodular: clínicamente se presenta como un nódulo con bordes precisos, bien definidos y, frecuentemente, su superficie es brillante. El color está distribuido de manera uniforme y puede ser negro o sin pigmento (amelanótico) lo que le confiere el color rosa o rojo. Comparado con el melanoma de extensión superficial, es más común en hombres y se localiza preferentemente en el tronco, el cuello y la cabeza.⁵⁶

Histológicamente, se caracterizan por presentar masas sólidas de melanocitos atípicos en la dermis con escaso componente intraepidérmico (Figura 5). La morfología celular es variable, con frecuencia son células redondeadas u ovals con

aspecto epitelióide, que en general no maduran en las capas profundas de la dermis y suelen presentar numerosas mitosis.⁵⁶

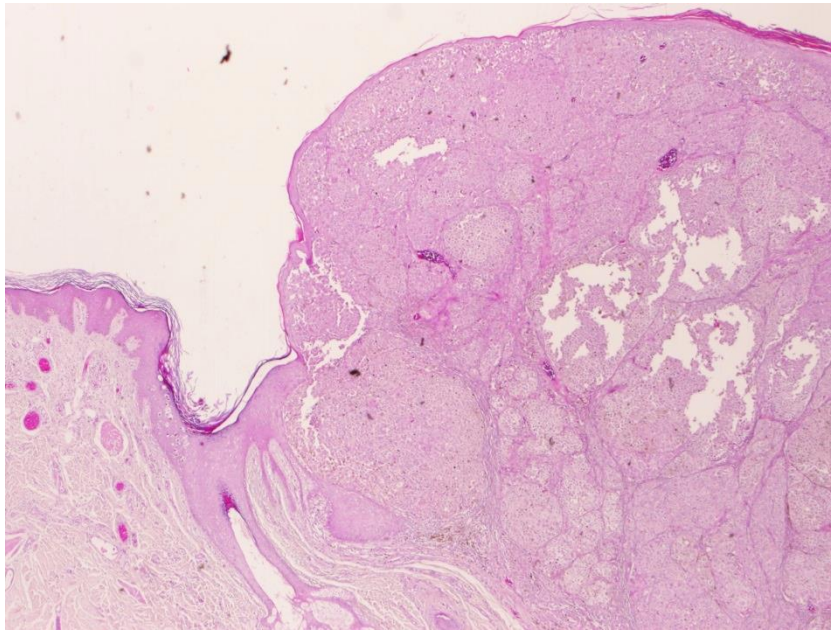


Figura 5. Imagen histológica de melanoma nodular

-Melanoma tipo léntigo maligno: el léntigo maligno (melanoma in situ) se localiza en áreas expuestas en forma crónica al sol, como la cara y los antebrazos, en personas de edad avanzada. Desde el punto de vista clínico, la lesión inicial es una mácula asimétrica color parda, con bordes irregulares, la cual se va oscureciendo con el paso del tiempo. Puede aparecer en la cuarta década de la vida e incluso antes. Después de la fase de crecimiento radial, que puede llegar a durar más de 20 años, se evidencia el crecimiento vertical, evolucionando a un nódulo pigmentado sobre la mácula y son estos cambios los que indican la progresión a melanoma léntigo maligno.⁵⁴

Histológicamente, el melanoma léntigo maligno se caracteriza por un componente epidérmico de melanocitos atípicos que se disponen de forma aislada y en pequeños nidos localizados en la capa basal de la epidermis. Se suele asociar con atrofia epidérmica y típicamente muestra marcada elastosis en dermis (figura 6). El componente invasivo puede estar compuesto por melanocitos epitelioides o fusiformes, con atipia citológica variable.⁵⁷

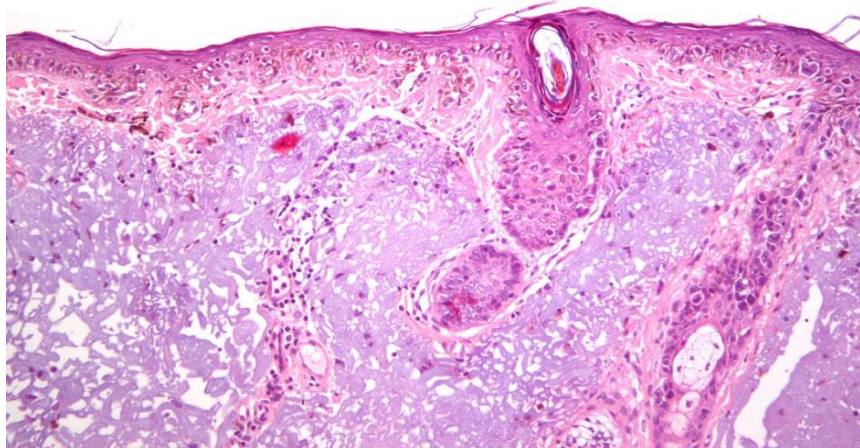


Figura 6. Imagen histológica de léntigo maligno

-Melanoma lentiginoso acral: Por definición, se encuentra en palmas, plantas y lechos ungueales, y clínicamente se presenta como una mácula o placa pigmentada de coloración oscura y bordes irregulares. Corresponde a menos de 10% en pacientes blancos, más de 50% en asiáticos y 60% a 70% en poblaciones de raza negra.⁵⁸

Desde el punto de vista histológico, se caracteriza por una fase de crecimiento radial en la que se observa una hiperplasia epidérmica con un patrón de distribución lentiginosa de los melanocitos atípicos, dispuestos en las capas más basales de la epidermis.⁵⁷

1.6. FACTORES PRONÓSTICOS DEL MELANOMA CUTÁNEO PRIMARIO

El pronóstico de un paciente con melanoma cutáneo localizado (estadio I y II) diagnosticado de novo depende principalmente de tres factores, los cuales fueron confirmados por el análisis multivariable llevado a cabo por la AJCC. Estos factores en orden de importancia son: El índice de Breslow, índice mitótico y la

presencia de ulceración.⁶⁰ Sin embargo hay otros factores histológicos que influyen en el pronóstico de la enfermedad.

1.6.1. ÍNDICE DE BRESLOW

Se considera el factor pronóstico más importante en los estadios I y II del melanoma; aunque siempre deben relacionarse otros factores para definir el pronóstico real de la enfermedad. El sistema de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) estadifica el grosor del tumor en cuatro categorías: $\leq 1,0$ mm; 1,01 a 2,0 mm; 2,01 a 4,0 mm y $>4,0$ mm.⁵⁹

La medida del índice Breslow se relaciona en forma directa con el volumen del tumor y esto explica su valor pronóstico. A medida que este valor aumenta, disminuye la supervivencia a 5 y 10 años por lo que la tasa de supervivencia a 5 años en un paciente sin ulceración es: para Breslow ≤ 1 mm 95%, 1.01–2 mm 89%, 2.01–4 mm 79% y > 4 mm 67%. Para pacientes con ulceración la tasa de supervivencia a 5 años es: para Breslow ≤ 1 mm 91%, 1.01–2 mm 77%, 2.01–4 mm 63% y > 4 mm 45%.^{61,62}

1.6.2. ÍNDICE MITÓTICO

El índice mitótico es un indicador de proliferación tumoral medido como mitosis por mm² el cual se determina identificando el área de la dermis con el mayor número de figuras mitóticas “hot spot”.⁶¹

El análisis de la AJCC 2009 mostró un peor pronóstico con el aumento de la tasa mitótica. La supervivencia a 5 años es de 97% para < 1 mitosis/mm² y del 60% para más de 20 mitosis/mm² para melanomas en estadio I y II.⁶²

1.6.3. ULCERACIÓN

Desde el punto de vista histológico, la ulceración requiere la combinación de a) pérdida de todo el espesor de la epidermis, y b) evidencia de cambios reactivos (por ejemplo, depósito de fibrina o neutrófilos).⁶³

La presencia de ulceración disminuye la supervivencia en todos los estadios tumorales. Estudios han mostrado que la supervivencia se disminuye de un 80% a un 55% en pacientes con ulceración, con un riesgo de morir 2 veces mayor para los que tienen ulceración.^{62,64} Balch y colaboradores⁶⁵ demostraron una reducción de 80% a 55% en la supervivencia en pacientes que presentaban ulceración en comparación con los que no la presentaban, asociado a una medida del índice de Breslow significativa.

1.6.4. LINFOCITOS INTRATUMORALES

Se considera que el sistema inmune desempeña un papel importante en el control del crecimiento del melanoma. Debido a esto, el infiltrado inflamatorio asociado al tumor (tumor infiltrating lymphocytes [TIL]) se ha valorado como una respuesta inmune del huésped hacia el melanoma. Sin embargo, su papel inmunológico, así como su implicación pronóstica aún son controvertidos.⁶⁶

De acuerdo con la descripción de Clark y colaboradores⁶⁷ se debe considerar como TIL los linfocitos que rodean la fase de crecimiento vertical del melanoma o que la infiltran. Se considera que este infiltrado es intenso si infiltra todo el componente invasivo del tumor, o si rodea el margen profundo de la fase vertical. Se define como débil si el infiltrado es focal. Por último, se define como ausente si no existe, o si está presente pero no infiltra el tumor. En este estudio inicial la supervivencia global a los 8 años para los pacientes con melanoma en fase vertical fue del 88% para los pacientes con melanomas con TIL intensos, 75% para los pacientes con TIL débil y 59% para los pacientes con TIL ausentes. Con posterioridad se han publicado trabajos con resultados similares,⁶⁸ e incluso en un estudio la supervivencia fue del 100% a los 5 años (93% a los 10 años) en los pacientes con TIL intenso.⁶⁹

1.6.5. FASE DE CRECIMIENTO TUMORAL

La progresión tumoral tiene dos fases, radial y vertical. La fase de crecimiento radial, se caracteriza por el lento crecimiento y proliferación de células atípicas, sin

presentar mitosis; el tumor crece de manera horizontal y se confina a la epidermis; aunque esta lesión es maligna, su completa resección da al paciente porcentajes de curación cercanos al 100%. La fase de crecimiento vertical se caracteriza por la formación de un nódulo tumoral que se extiende hacia la dermis e hipodermis, en donde las células malignas tienen la capacidad de diseminación activa. La probabilidad de metástasis tiene una relación directa con la profundidad y, muy especialmente, con el grosor.^{62,70}

1.6.6. REGRESIÓN

Corresponde al reemplazo de tejido tumoral por un infiltrado linfocitario, apoptosis de células de melanoma, presencia de melanófagos, proliferación vascular, y por último, fibrosis colágena. La incidencia de regresión en tumores ≤ 0.75 mm es del 58% y se ha considerado que una regresión $> 50\%$ puede tener significancia pronóstica. Sin embargo, este es el factor que más carece de unanimidad en la literatura, tanto en su definición como en su utilidad pronóstica.^{62,66}

1.6.7. SUBTIPO HISTOLÓGICO

El melanoma nodular históricamente se ha relacionado como el subtipo de peor pronóstico, pero esto no se debe en sí al subtipo sino a la medida del índice de Breslow en el cual es diagnosticado, ya que este tumor no presenta crecimiento radial, el crecimiento vertical es más precoz y alcanza más rápidamente profundidad en la dermis que los otros subtipos de melanoma. Así que no puede ser evaluado como factor pronóstico independiente. Este subtipo histológico de melanoma se origina de células madre localizadas en la dermis y, por esto, al menos en su fase inicial, la epidermis superior no tiene melanocitos tumorales.⁵⁴

Actualmente, muchos autores han cuestionado la utilidad pronóstica más allá de la que se produce por la propia localización del melanoma, por lo que ven poco útil tomar el subtipo histológico como factor pronóstico.^{71,72}

1.6.8. INVASIÓN LINFOVASCULAR

Se considera que existe invasión vascular en el melanoma cuando se observan inequívocamente células de melanoma en la luz vascular, siendo un factor pronóstico independiente de mal pronóstico.^{73,74} La presencia de invasión vascular es infrecuente para melanomas menores de 1,5 mm, aumentando su frecuencia con el grosor.⁷⁴

1.6.9. INVASIÓN PERINEURAL

Se define como la infiltración neoplásica de las fibras nerviosas con la consecuente extensión del tumor a través de estos nervios.⁷⁵

En cuanto al pronóstico, en un estudio que contó con 190 pacientes con melanoma desmoplásico y 90 pacientes con melanoma desmoplásico neurotrópico no se encontraron diferencias significativas en lo que respecta a la supervivencia de ambos grupos comparadas con otras formas clínico-patológicas. La variante de melanoma desmoplásico neurotrópico se relacionó con una mayor frecuencia de recurrencias locales.⁷⁶ En un estudio más reciente se han publicado unas tasas de recurrencias locales más bajas. Es posible que esta diferencia se deba a la aplicación de unos márgenes de resección más ajustados.⁷⁷

1.6.10. METÁSTASIS

El término satelitosis fue empleado por primera vez por Day y colaboradores en 1981,⁷⁸ actualmente se denomina metástasis en tránsito. Se refiere a la existencia de nidos de células de melanoma de un tamaño mayor de 0,05 mm separados claramente de la masa tumoral por una capa de colágeno o grasa subcutánea de al menos 0,3 mm. Éstas han sido estudiadas como factor pronóstico, acompañadas del índice de Breslow, ya que es muy raro encontrarlas en tumores menores de 2 mm de profundidad; los estudios las reportan como factores de mal pronóstico, ya que representan metástasis locales de tumores en crecimiento vertical.⁷⁰

La supervivencia a 10 años en pacientes con metástasis ganglionares microscópicas es de un 63% comparados con un 47% para metástasis macroscópicas.⁴⁷ El predictor de supervivencia más importante es el tipo de metástasis en el momento en el que se presenta por primera vez. Los pacientes que presentan sólo metástasis local tienen mejor pronóstico que aquellos que presentan formas más avanzadas de metástasis.

1.7. GENES, MUTACIONES Y MECANISMOS MOLECULARES

La patogénesis del melanoma es compleja y no se comprende totalmente; para su desarrollo es necesaria la transformación maligna de melanocitos, que ocurre tanto en individuos genéticamente normales como genéticamente predispuestos.

Las alteraciones genéticas identificadas en melanomas en diferentes sitios y con diferentes niveles de exposición al sol indican que hay distintas vías genéticas en el desarrollo de melanoma e implican a CDK4 y CCND1 como oncogenes independientes en melanomas sin mutaciones en BRAF o N-RAS.⁷⁹

1.7.1. GEN CDKN2A

Desde la década de los 90 se han descrito varias mutaciones y polimorfismos germinales de este gen; es el de mayor riesgo conocido hasta el momento y el mejor estudiado.^{80,81} Es un gen supresor tumoral, localizado en el cromosoma 9p21.

Este gen está alterado (inactivado) tanto en melanomas incipientes como en melanomas evolucionados y se detectan pérdidas muy extensas en los melanomas metastásicos.

Las alteraciones del CDKN2A se hallan principalmente en casos de melanoma familiar, y es la causa más común de la susceptibilidad hereditaria al melanoma. Asimismo, se han descrito sus mutaciones, en menor medida, en pacientes con melanoma esporádico, principalmente con melanomas primarios múltiples. También es un gen de alto riesgo para el desarrollo del cáncer de páncreas. No se

han encontrado mutaciones de novo. Todas se heredan en forma autosómica dominante con penetrancia variable.⁸²

CDKN2A se encuentra en el cromosoma 9p21 y se compone de 4 exones (E) - 1 α , 1 β , 2, y 3-, la mayoría de las mutaciones ocurren en el exón 2. Mutaciones en este locus se relacionan con susceptibilidad para el desarrollo de melanoma familiar y mutaciones 9p21 se han observado en diferentes líneas celulares de cáncer. Este gen codifica dos proteínas supresoras tumorales: p16 o INK4A (inhibitor of CDK4), codificada en los exones 1 α , 2 y 3, y p14 o ARF (alternate reading frame), codificada en el exón 1 β , 2 y 3. Ambas proteínas inhiben el ciclo celular y regulan la diferenciación. La p14 también regula la apoptosis. Actúan a través de la vía de la p53 y de la proteína del retinoblastoma (Rb).⁸³ La afectación del exón 1 β es excepcional, altera preferentemente a la p14, y se asocia a la aparición de melanoma y de tumores del sistema nervioso central.⁸³

INK4A es el miembro de la INK4 (inhibidor de la quinasa ciclina dependiente), e inhiben las quinasa dependiente de ciclina D1 (CDK),^{84,85} que fosforila e inactiva la proteína del retinoblastoma (RB), permitiendo de este modo la entrada a fase S del ciclo celular. Por lo tanto, la pérdida de la función RB INK4K promueve la inactivación a través de la hiperfosforilación, lo que resulta en la progresión del ciclo celular sin restricciones.⁸⁶

La proteína ARF (Alternativa Reading Frame) del locus, inhibe la ubiquitinación mediada por HDM2 y la posterior degradación de p53.⁸⁷ En condiciones normales ARF funciona como supresor tumoral deteniendo el ciclo celular o promoviendo la muerte celular cuando existe un daño en el ADN.⁸⁸ Por lo tanto, la pérdida de ARF inactiva otro supresor de tumores, p53. La pérdida de p53 afecta los mecanismos que normalmente se dirigen a las células dañadas genéticamente para la detención del ciclo celular y/o apoptosis, lo que conduce a la proliferación de las células dañadas. Pérdida de CDKN2A por lo tanto, contribuye a la tumorigénesis por la interrupción tanto de la pRb y las vías de p53.⁸⁹ (figura 7).

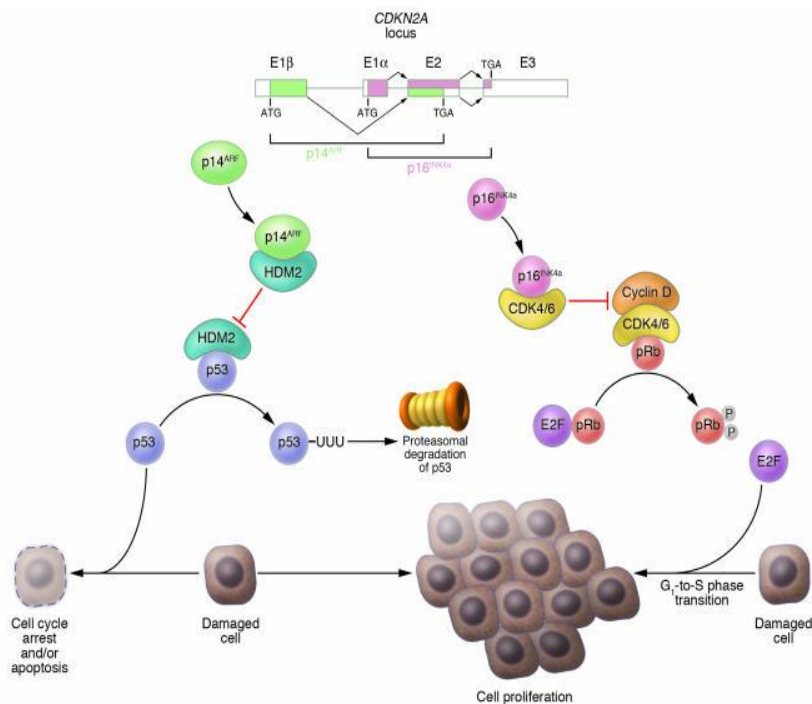


Figura 7. Mecanismos de acción de INK4 y ARF. (Chudnovky y Cols, 2005) ⁸⁴

1.7.2. GEN CDK4A/CCND1

El CDK4A (cyclin-dependent kinase 4) es un oncogén codificado en 12p14. La mutación de este gen, tanto somática como germinal, es mucho menos frecuente que la del CDKN2A, pero se ha descrito en algunos grupos familiares.⁹⁰ Como el CDK4 actúa a través de la vía del retinoblastoma, el fenotipo es similar al de la p16.^{91,92} Sin embargo, cuando CDK4 está mutado en el codón 24 (es decir, Arg24His y Arg24Cys), la enzima se vuelve resistente a la p16 y funciona como un oncogén de herencia autosómica dominante.^{82,93} Las pocas familias con mutaciones CDK4 exhiben esencialmente el mismo fenotipo que las mutaciones de p16 de la línea germinal.

La p16 inhibe al CDK4, impidiendo el crecimiento de células con daño del ADN o con activación de oncogenes (Figura 8) El oncogén CCND1 (ciclina D1) es un componente del complejo CDK4 y recientemente se ha descrito su amplificación en el 45% de los melanomas acrales, tanto en las células tumorales como en las adyacentes (“field cells”), hasta 10 mm del tumor. La amplificación de CCND1 sería un evento inicial en el desarrollo del melanoma acral. También se ha descrito en melanomas mucosos.^{79, 94,95}

Sin embargo, cuando CDK4 está mutado en el codón 24 (es decir, Arg24His y Arg24Cys), la enzima se vuelve resistente a la p16 y funciona como un oncogén autosómico dominante hereditario.^{90,93} Las pocas familias con mutaciones CDK4 exhiben esencialmente el mismo fenotipo que las con mutaciones de p16 de la línea germinal. Además, la evidencia apoya aún más un papel para la vía Rb en el melanoma proviene de informes de que las mutaciones en la línea germinal en el gen del retinoblastoma (RB1) sí llevan a una de cuatro veces a 20 veces más riesgo de melanoma.⁸² Estos hallazgos indican que múltiples mecanismos que funcionan para omitir la detención del ciclo celular G1 Rb-dependiente están involucrados en el desarrollo del melanoma maligno.⁹⁵

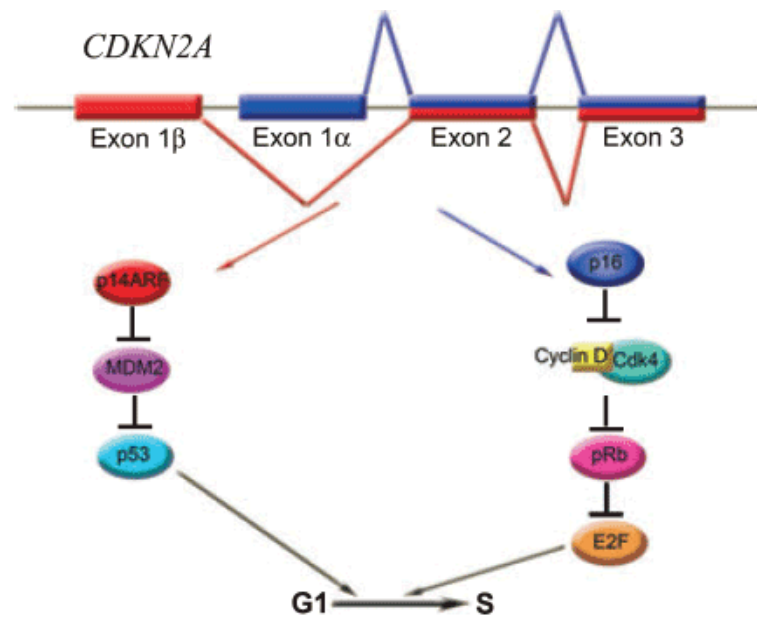


Figura 8. Representación esquemática del gen CDK4 con sus 3 exones y sus productos, las proteínas p14 y p16 (Lin T.L, y Cols. 2008)⁹⁴

1.7.3. GEN MCR 1

MC1R (el receptor de la melanocortina 1), localizado en el extremo telomérico del cromosoma 16q24.3, constituye el único gen identificado que explica una parte sustancial de la variación fenotípica humana.⁹⁶

Este gen, de alta prevalencia pero baja penetrancia, codifica para el receptor transmembrana de la MSH α y la ACTH, localizado en varios tipos celulares y en los melanocitos. La unión de la MSH a su receptor activa la síntesis de AMPc, el

cual estimula la producción de eumelanina, la proliferación del melanocito y también ejerce efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y antioxidantes (por estímulo de la catalasa).^{97,98}

Es un gen altamente polimorfo, del que existen más de 100 variantes alélicas, presentes en el 70% de la población. Los polimorfismos con mayor riesgo para el desarrollo del melanoma son Arg142His, Arg 151 Cys, Ile155Thr, Arg160Tpr, Arg126Gln y Asp294His.^{99,100} Estas variantes determinan una menor afinidad del receptor por la MSH. La mayoría han sido descritos en personas de piel clara, con efélides y pelo rojo (variantes “R”), pero también aumentan la susceptibilidad al melanoma en personas de piel oscura. Cada individuo puede portar más de un polimorfismo del MCR1. Estos polimorfismos confieren riesgo moderado para el desarrollo del melanoma. Las mutaciones del MCR1 confieren riesgo de mutación del BRAF en algunos pacientes.¹⁰¹

1.7.4. MUTACIONES SOMÁTICAS EN MELANOMA: 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 ERK1/2 se traslocan al núcleo y conducen a la activación de los factores de transcripción de varios genes.¹⁰² Esta vía se encuentra conservada a través de la evolución y transfiere información desde el medio ambiente (factores de crecimiento, mitógenos y receptores de antígenos, por stress, y estímulos inflamatorios, por radiación ultravioleta) al núcleo a través de tres niveles de la vía que implica la fosforilación secuencial de tres vías MAPK kinase kinase (MAPKKK), MAPK kinase (MAPKK) and MAPK (figura 9).¹⁰³

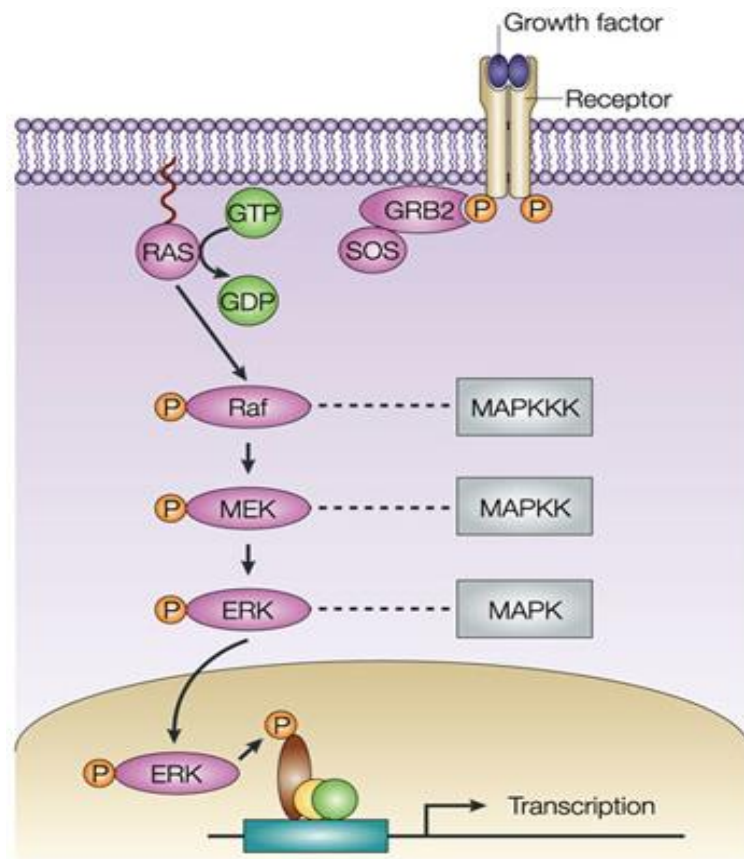


Figura 9. Representación esquemática de la vía MAPK

Una de las alteraciones moleculares presentes en un mayor número de melanomas implica a la vía de señalización intracelular MAPK, esta vía 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.¹⁰⁴

1.7.4.1. MUTACIONES ACTIVADORES DE LOS GENES RAS

Las mutaciones activadoras de los genes RAS (figura 10) han demostrado ser una importante vía de la señalización celular para la proliferación y transformación maligna de los tumores. Dichas mutaciones se han encontrado en melanomas humanos, con una incidencia: 10-15%.¹⁰⁵ mientras que las mutaciones H-RAS y K-RAS son poco frecuentes (1%).⁸² Una explicación racional para la mayor ocurrencia de mutaciones N-RAS se basa en diferencias entre las capacidades de señalización de N-RAS y K-RAS en melanocitos.¹⁰⁶

Actualmente hay un gran debate en relación a si isoformas específicas de RAS están correlacionadas con patrones específicos de exposición solar, presentación clínica y características morfológicas convencionales.¹⁰⁹ Estudios recientes muestran que el 56% de los nevos congénitos,¹¹⁰ el 33% de los melanomas primarios, y el 26% de los melanomas metastáticos presentan mutaciones puntuales de N-RAS.¹¹¹ Sin embargo, raramente se observan en nevos displásicos.¹¹² No se han descrito mutaciones en K-RAS en lesiones melanocíticas.⁸²

El gen N-RAS (Neuroblastoma Rat Sarcoma), se encuentra localizado en el cromosoma 1p13.2, La mayoría de las mutaciones de *NRAS* se detectan en el codón 60 o 61 del exón 3 (80%), y en el codón 12 o 13 del exón 2 (20%).¹³¹ Está mutado en aproximadamente el 15-20% de los melanomas primarios cutáneos en pacientes caucásicos.¹¹³ En la población Africana y Asiática se ha encontrado una frecuencia más baja de la mutación (12% y 7,2% respectivamente)^{114,115}. Las mutaciones N-RAS consiste específicamente en el reemplazo de un aminoácido de la proteína N-RAS, básicamente reemplaza el aminoácido Glutamina que se encuentra en la posición 61 por otro aminoácido, en este caso: Lisina o Arginina (p.Q61L, p.Q61R).¹³¹

No se ha observado correlación de la presencia de mutación N-RAS con el género de los pacientes,¹¹⁶ aunque se ha visto que la población que expresa la mutación tiene mayor edad comparados con los pacientes que presentaban la mutación B-RAF.¹¹⁷

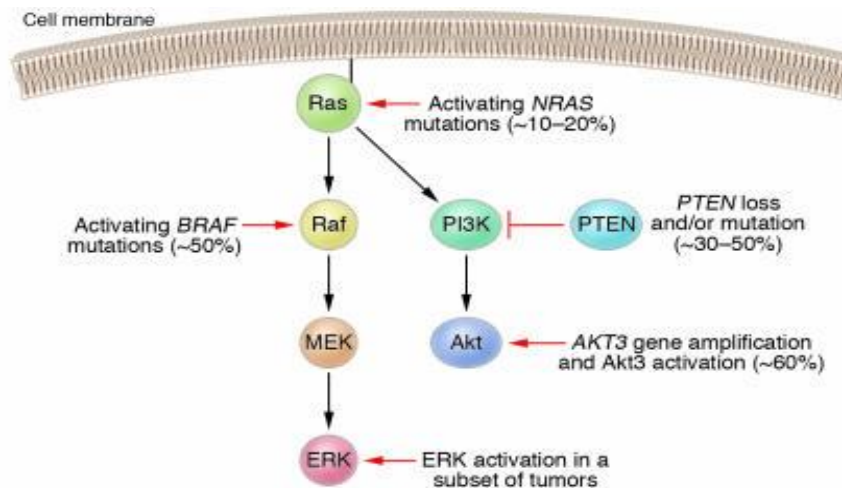


Figura 10. Representación esquemática de la vía de mutación N-RAS

En cuanto a la incidencia de la mutación N-RAS de acuerdo a la distribución por sitio anatómico, estudios reportan que el sitio de mayor frecuencia de localización son las extremidades (25%), seguido de cabeza y cuello (18%) y tronco (18%) que comparten la misma frecuencia.^{117, 118, 119} Un dato interesante que se ha reportado, es la alta frecuencia de melanoma con mutación N-RAS de primario desconocido (32%).¹²⁰

Acerca del tipo histológico, la mutación N-RAS tiene una mayor prevalencia en melanomas de tipo nodular, cifras que van desde el 25-31% de los casos reportados.^{107, 118}

Mientras que algunos autores reportan el índice de Breslow como significativo en relación a la presencia de la mutación,^{121, 122, 123} otros estudios no confirman esta asociación” así como la presencia o ausencia de mitosis y ulceración.^{124, 125}

- El B-RAF (homólogo del oncogén del sarcoma viral murino: v-raf) es el más potente activador del MEK y es el oncogén más frecuentemente mutado en cáncer, incluyendo al melanoma (20-80%) y su mutación somática más frecuente es la p.V600E (90%)⁹¹. Se acompaña generalmente de polimorfismos del MCR1.¹²⁶ Uno de los factores que estimula las mutaciones del BRAF es la radiación ultravioleta. Si bien el mecanismo exacto de acción en el melanoma es

desconocido, se sabe que su mutación constituye el paso inicial y necesario para la génesis tumoral.

La mutación del BRAF altera la cascada RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2, lo cual estimula la proliferación e invasión celular.^{127,128} Recientemente, se ha encontrado un subgrupo de melanomas con diferentes mutaciones (no V600E) del RAF, en los que la activación del ERK se produce a través del CRAF. Estos tumores son más susceptibles a la acción del sorafenib.¹²⁹

Los melanomas asociados a mutación del BRAF tienen predilección por áreas de exposición solar intermitente intensa, como tronco y miembros, y afectan en mayor medida a pacientes jóvenes (40 años o menos), con gran número de nevus. Las mutaciones del BRAF predominan en los melanomas de extensión superficial y melanomas nodulares. En cambio, los melanomas mucosos y acro-lentiginosos tienen baja frecuencia de mutaciones de este gen.¹³⁰

1.8. PD-1/PD-L1

El PD-1, es un homólogo del CD28 y CTLA4 está implicado en la apoptosis celular, controlando la activación de los linfocitos y el consecuente daño tisular durante la respuesta inmune, además de mantener la tolerancia periférica.¹³² El PD-L1 es una proteína de superficie celular que se expresa de manera constitutiva en las APC (macrófagos y células dendríticas) y es posible inducirla en algunos tipos celulares en respuesta a citoquinas proinflamatorias en una gran variedad de tejidos (linfocitos T activados, células B, monocitos, células epiteliales y endoteliales).¹³³ La expresión de PD-L2 está restringida principalmente a las células dendríticas y macrófagos.

La coestimulación es esencial para la activación de la respuesta celular del sistema inmune. El modelo fue descrito por Lafferty y cols, en la década de los 70,¹³⁴ momento en que se infirió que la activación de las células T necesitaba de dos señales, la primera más específica, mediada por reconocimiento del antígeno a través del RCT en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (CPH),

adicionalmente una señal coestimuladora, que facilitaría la expansión de clones y el posterior desarrollo de una respuesta de tipo específica.

Este modelo ha tenido actualizaciones y es así como además de la coestimulación que puede generar respuestas efectoras, también a través de la expresión y transducción de otras señales como la del CTLA-4 asociado al linfocito T citotóxico y del PD1 (molécula de muerte programada 1), se ha demostrado la inducción de fenómenos de tolerancia y el desarrollo de distintas enfermedades.¹³⁵

El PD-1 fue descubierto en 1992 gracias a su expresión durante la apoptosis en un modelo de hibridoma de células T,¹³⁶ está codificado por el gen *Pdcd1*, en el brazo largo del cromosoma 2 (2q37.3), y consta de cinco exones, el primero codifica para una secuencia de señal corta, el segundo exón codifica el dominio globular, el tercero la región transmembrana, el cuarto una secuencia de 12 aminoácidos (aa) que marca el inicio del dominio intracitoplasmático y el quinto codifica la secuencia carboxilo terminal y la región no transcrita en 3'.¹³⁷

El PD-1 es una proteína de 288 aa de longitud compuesta por tres dominios (globular extracelular, transmembranal e intracelular). El dominio Intracelular contiene el inhibidor del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y el motivo de cambio del inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM), que son los que permiten la unión de moléculas adaptadoras con dominios SH2. Se han descrito dos ligandos del PD-1, el PD-L1 o B7-H1 (figura 11) que consta de 290 aa (codificado por el gen *CD274* en el cromosoma 9) y el PD-L2 o B7-DC (codificado en el gen *Pdcd1lg2*), ambos son glicoproteínas transmembrana de tipo I con dominios extracelulares tipo IgC e IgV.¹³⁸⁻¹³⁹

PD-L1 se expresa estructuralmente en las células B y T, macrófagos y células dendríticas y adicionalmente en respuesta a varios estímulos como anticuerpos anti-IgM, anti-CD40, anti-CD3, LPS, INF- γ , IL-4, IL-12 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).¹⁴⁰ El PD-L2 no se expresa en forma nativa, pero puede ser inducido en las células T, B, los macrófagos y las células dendríticas.¹⁴¹

El PD-1, al interactuar con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) envía señales intracelulares que inducen a disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias causando efectos en la diferenciación y supervivencia celular por la inhibición temprana de las señales de activación a través del CD28 o de manera indirecta, por medio de IL-2. Tanto el CD28 como la IL-2 promueven la expansión y supervivencia natural a través de efectos antiapoptóticos sobre el ciclo celular y sobre la activación de los genes de citoquinas.¹⁴² Es este el mecanismo del que se han beneficiado las células tumorales para evadir la respuesta del sistema inmune, permitiendo su supervivencia y crecimiento.¹⁴³⁻¹⁴⁴ Las células de estirpe tumoral expresan antígenos que pueden ser reconocidos muy fácilmente por el sistema inmune, pero poseen la capacidad de liberar factores solubles y expresar moléculas de superficie que inhiben la activación y liberación de agentes quimiotácticos en las células T, como es el caso de la expresión del ligando PD-L1, el cual se encuentra elevado en las células tumorales^{145,146} y que se ha correlacionado con un mal pronóstico en los pacientes con cáncer.^{147, 148}

La terapia con agentes bloqueadores de PD-1 (PD-1Ig y PD-L1Ig) es una potencial diana terapéutica que se ha mostrado eficaz disminuyendo la formación tumoral en modelos animales,¹⁴⁹ al igual que lo ha sido la terapia génica para detener la progresión del melanoma metastásico de pulmón usando plásmidos de ADN que contienen el gen de PD-1 y el tratamiento con anti-PD-1 en el control del crecimiento tumoral en mieloma.¹⁵⁰⁻¹⁵¹ Existen actualmente en el mercado dos anticuerpos anti-PD-1 para tratar melanomas resistentes al tratamiento y recaídas tumorales el Pembrolizumab y el Nivolumab,¹⁵² ambos cuentan con la aprobación para su comercialización y uso por parte de la Unión Europea y la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos.

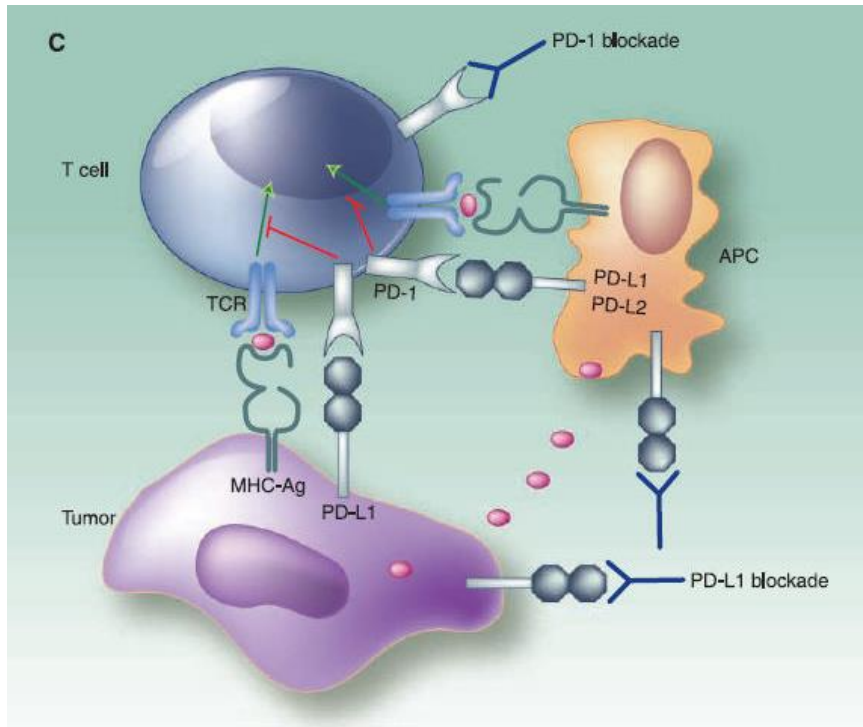


Figura 11. Vía de señalización PD-1/PD-L1

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.1 OBJETIVOS GENERALES

- 1- Determinar si el estado mutacional del oncogén N-RAS tiene influencia en el pronóstico de los pacientes con melanoma cutáneo.
- 2- Establecer la posible asociación de PD-L1 y PD-1 con el estado mutacional de N-RAS y asimismo la influencia de ambos marcadores en la evolución clínica de los pacientes con melanoma cutáneo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudio de la correlación del estado mutacional de N-RAS con las características clínico-patológicas del melanoma cutáneo.
- 2- Estudiar la posible asociación entre el estado mutacional de N-RAS en el melanoma primario y la evolución clínica de los pacientes: intervalo libre de enfermedad, desarrollo de metástasis regionales y/o a distancia y la supervivencia específica de tumor.
- 3- Establecer la correlación de la expresión inmunohistoquímica NRAS Q61R con el estado mutacional de N-RAS determinado por secuenciación.
- 4- Evaluar la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 y PD-1 en los melanomas primarios
- 5- Estudiar la posible asociación de los marcadores PD-L1 y PD-1 con el estado mutacional de N-RAS, y con parámetros pronósticos clínico-patológicos clásicos.
- 6- Estudiar la posible relación de los marcadores PD-L1 y PD-1 con la evolución clínica de los pacientes: intervalo libre de enfermedad, desarrollo de metástasis regionales y/o a distancia y la supervivencia específica de tumor.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Nuestro estudio incluyó inicialmente 137 muestras de melanoma cutáneo, correspondientes al mismo número de pacientes, registradas en la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Quirón de Torrevieja entre los años 2001 y 2014. Dichas muestras tisulares habían sido fijadas en formol neutro al 10% e incluidas en parafina, y sobre ellas se había realizado el estudio rutinario para diagnóstico histopatológico.

Criterios de exclusión:

Fueron excluidos todos los pacientes menores de 18 años, los casos en los que el tejido tumoral fue insuficiente para completar la totalidad del estudio y pacientes cuyo seguimiento no pudo realizarse quedando 126 casos totales para realizar el estudio.

3.1. ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO

3.1.1. ESTUDIO CLÍNICO

Los datos clínicos generales y de seguimiento se obtuvieron del archivo de historias clínicas del Hospital Quirón de Torrevieja; se realizó un seguimiento clínico de todos los pacientes con melanoma cutáneo primario hasta marzo de 2015, y se registró la aparición de metástasis, en tránsito, ganglionares y a distancia, así como el momento de su aparición y la localización. Del mismo modo, se registraron las fechas de éxitus y su causa. Además se recogieron una serie de parámetros clínicos desde el momento del diagnóstico hasta final del seguimiento.

Las variables clínicas estudiadas fueron:

1. Sexo: 0-Mujer; 1-Hombre.
2. Edad: En años en el momento del diagnóstico.

3. Localización de la lesión: 0-Desconocida; 1-Extremidad inferior; 2-Extremidad superior; 3-Tronco; 4-Cabeza y cuello.
4. Existencia de recidiva local: 0-No; 1-Si.
5. Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de recidiva local.
6. Existencia de metástasis en tránsito: 0-No; 1-Si.
7. Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de la metástasis en tránsito.
8. Existencia de metástasis ganglionar: 0-No; 1-Si.
9. Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de metástasis ganglionar.
10. Existencia de metástasis a distancia: 0-No; 1-Si.
11. Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de metástasis a distancia.
12. Exitus: 0-No; 1-Si.
13. Tiempo de supervivencia expresado en meses desde el diagnóstico de la lesión primitiva.
14. Fecha de fin de seguimiento expresado en meses

3.1.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO

El análisis histológico se realizó sobre muestras de tejido fijadas en formaldehído tamponado al 10%, que fueron procesadas en alcoholes a concentraciones crecientes (deshidratación) y en xiloles, para, a continuación, ser incluidas en parafina. Se realizaron secciones de tres micrómetros y se montaron en portaobjetos con Poly-L-Lysina para el estudio microscópico mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Protocolo tinción de hematoxilina-eosina:

1. Se incubaron las muestras a 60°C aproximadamente 20 minutos antes de desparafinar.
2. Se desparafinaron las muestras en xilol, tres baños de 10 minutos cada uno.
3. Se realizaron pases por etanol a concentraciones decrecientes (90°/80°/70°) para hidratar, durante tres minutos por cada coplin de alcohol.

4. Se lavaron las muestras con abundante agua corriente, agitando enérgicamente el cestillo hasta que se lavaran uniformemente.
 5. Se realizó la tinción nuclear con hematoxilina de Harris durante 5 minutos y posteriormente se lavaron las muestras con agua destilada 2 minutos hasta conseguir que el agua saliera transparente.
 6. Para decolorar, se sumergieron las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% (un pase rápido). Se lavaron con agua corriente y luego con hidróxido de amonio. Nuevamente se realizó un lavado rápido con agua corriente.
 7. Para la tinción citoplasmática, se sumergieron las muestras en eosina durante 4 minutos. Se lavaron con agua corriente (inmersiones rápidas).
 8. Se deshidrataron las muestras con pases de etanol (70°/80°/90°), aproximadamente de 30 segundos. Finalmente se aclararon con xilol, 1 minuto.
 9. Se montaron con Entellan® y cubreobjetos.
- En cada caso se procedió al estudio histológico de las secciones previas disponibles (1-5 laminillas).

Variables Histológicas

1. Tipo histológico de melanoma: 1-Melanoma de extensión superficial; 2-Melanoma nodular; 3-Melanoma tipo/sobre léntigo maligno; 4-Otros.
2. Fase de crecimiento radial: 0-No; 1-Si.
3. Fase de crecimiento vertical: 0-No; 1-Si.
4. Espesor en mm (Breslow): Medida en mm.
5. Nivel de Clark: 1-I; 2-II; 3-III; 4-IV; 5-V.
6. Presencia de ulceración: 0-No; 1-Si.
7. Número de mitosis por mm².
8. Tipo celular predominante: 1-Epiteliode; 2-Fusocelular y desmoplásico; 3-Spitzoide; 4-Globoide/balonizado.
9. Existencia de regresión: 0-No; 1-Si

10. Presencia de infiltrado linfocitario peritumoral: 0-Ausente o mínimo; 1-Discontinuo; 2- Denso.
11. Presencia de infiltrado linfocitario intratumoral: 0-Ausente; 1-Débil; 2-Moderado; 3-Intenso.
12. Presencia de satelitosis: 0-No; 1-Si.
13. Presencia de lesión melanocítica asociada: 0-No; 1-Nevus melanocítico común; 2-Nevus congénito; 3-Nevus atípico.
14. Presencia de elastosis actínica: 0-No; 1-Si

3.1.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Se realizó el estudio inmunohistoquímico de tres anticuerpos, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

Protocolo Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se realizó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Desparafinación:

Se calentaron las preparaciones histológicas a 65 °C durante toda la noche.

Se incubaron en un primer xilol durante 15 minutos y luego se realizaron pases rápidos por xilol limpio.

2. Rehidratación:

Se lavaron con alcohol absoluto.

Se lavaron con alcohol al 70%.

Se lavaron con alcohol al 50%.

Se lavaron bien con agua y agua destilada.

3. Desenmascaramiento antigénico:

Se realizó la recuperación antigénica en tampón Tris/EDTA con pH 9 (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako, código K8004). Se

incubaron las secciones en dicho tampón a una dilución de 1/50 en agua destilada durante 3 minutos, a 1.5 atmósferas de presión, en autoclave.

4. Bloqueo de peroxidasa endógena:

Una vez realizada la descompresión del autoclave se dejaron enfriar las preparaciones en los respectivos tampones y después se lavaron con agua, agua destilada y por último con TBS comercializado por Dako (EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831); solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20, concentrada 20 veces, pH 7.6 (± 0.1); para su uso se realizó una dilución 1:20 con agua destilada.

Se incubaron las preparaciones en solución de bloqueo de peroxidasa comercializada por Dako durante 10 minutos, que es una solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante (Ref. S2023). No se bloqueó el colágeno para evitar la tinción de fondo inespecífica, ya que gracias a la presencia de proteínas estabilizantes en los reactivos de Dako utilizados no es necesario (según la información aportada por la casa comercial).

5. Anticuerpo primario:

Se lavaron las preparaciones 3 veces con TBS.

Los anticuerpo empleados en secciones de las biopsias incluidas en parafina fueron: el anticuerpo policlonal PD-L1/CD274 de Thermo Scientific (nº de catálogo: PA5-30937) obtenido en conejo, el anticuerpo monoclonal N-RAS(Q61R) de Sigma-Aldrich (nº de catálogo: SAB-5500153) obtenido en conejo, clon SP174, y por último el anticuerpo policlonal PD-1/CD279 de Thermo Scientific (nº de catálogo: PA5-32543) obtenido en conejo (Tabla 1).

La diluciones empleadas para los anticuerpos primarios fueron las que se indican en la tabla (*1/500 para PD-L1, 1/100 para N-RAS y 1/150 para PD-1*), todos ellos en diluyente de anticuerpo comercializado por Dako (EnVision™ FLEX Antibody Diluent Ref. K8006; Tampón Tris, pH 7,2 que contiene 15 mmol/L de Na₃N y proteína).

Se incubó una hora a temperatura ambiente en el caso de los anticuerpos PD-L1 y PD-1 con un volumen final de 200 microlitros de anticuerpo primario diluido por cada preparación, y de 90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente en el

caso del N-RAS con un volumen final de 100 microlitros de anticuerpo primario diluido por cada preparación.

TABLA 1. Características de los anticuerpos utilizados (NRAS Q61R, PD-L1, PD-1)

ANTICUERPO	CLON	DILUCIÓN	PRE-TRATAMIENTO	SISTEMA DE VISUALIZACIÓN	CASA COMERCIAL
PD-L1/CD274 (PA5-30937)	POLYCLONAL RABBIT	1/500	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPÓN PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION DAKO (K5007)	THERMO SCIENTIFIC
N-RAS (Q61R) (SAB-5500153)	MONOCLONAL RABBIT (SP174)	1/100	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPÓN PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION DAKO (K5007)	SIGMA-ALDRICH
PD-1/CD279 (PA5-32543)	POLYCLONAL RABBIT	1/150	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPÓN PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION DAKO (K5007)	THERMO SCIENTIFIC

6. Sistema de visualización:

Se lavaron 3 veces con TBS.

Incubación de los anticuerpos secundarios: se realizó una incubación con EnVision durante 30 minutos (Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) Ref. K5007); se trata de dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo y ratón en solución tamponada, que contiene proteína estabilizante y conservante. Este reactivo es un polímero conjugado con peroxidasa, que también está recubierto de anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón. Se compone de un esqueleto de dextrano al que se han unido un gran número de moléculas de peroxidasa (HRP) y moléculas de anticuerpo secundario. Para la reacción de unión se ha utilizado una química única, que permite la unión de hasta 100 moléculas de HRP y hasta 20 moléculas de anticuerpo por esqueleto.

El anticuerpo secundario unido al esqueleto de dextrano se ha obtenido de cabras, y reacciona igualmente bien con inmunoglobulinas de conejo y ratón.

Se lavaron 3 veces con TBS.

Se lavaron con agua destilada.

Visualización de la reacción

Para la visualización de la reacción se incubaron las preparaciones durante 5 minutos en DAB (Substrate Working Solution) suministrada por el kit Dako REAL™ (EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Código K5007)). El kit contiene un Frasco B (Dako REAL™ Substrate Buffer) con 250 mL de solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante, y un Frasco C (Dako REAL™ DAB+ Chromogen) con 5 mL de 3,3' diaminobenzidina en solución de cromógeno. La solución Substrate Working Solution, que contiene DAB (CHROM), se prepara mezclando bien 20 µL de Dako REAL™ DAB+ Chromogen (frasco C) y 1 mL de Dako REAL™ Substrate Buffer (frasco B). El sistema de sustrato produce un producto final marrón claro en el lugar del antígeno diana.

Se paró la reacción lavando con agua destilada.

7. Tinción de contraste:

Se utilizó tinción de giemsa al 30% en agua destilada durante 2 minutos

Se lavaron las preparaciones con agua destilada

8. Deshidratación:

Se realizó con pases en alcoholes de graduación creciente hasta etanol absoluto.

9. Aclarado:

Se realizó mediante pases en Xilol.

10. Montaje:

Se cubrieron las preparaciones con cubreobjetos y Entellan®.

Variables Inmunohistoquímicas:

La positividad de la inmunotinción se valoró en función de la intensidad de la tinción y el porcentaje de las células teñidas. Todas las muestras fueron valoradas por dos patólogos expertos, sin previo conocimiento de los datos clínico-patológicos, siendo las variables estudiadas:

3.1.3.1. N-RAS (Q61R)

Es un péptido sintético de la proteína humana N-RAS que mide una mutación puntual (Q61R)

La forma de medición y codificación fue: 0-No realizado; 1-Negativo; 2-Débil; 3-Moderado-Intenso.

3.1.3.2. PD-1

PD-1 (Muerte programada-1), también llamado CD279, es una proteína de 55kD, Se expresa en los linfocitos T activados y B y células mieloides que funciona como un puesto de control inmune, desempeña un papel importante en la baja regulación del sistema inmune mediante la prevención de la activación de las células T, que a su vez reduce la autoinmunidad y promueve la auto-tolerancia.

La inmunotinción fue valorada: 0-Negativo; 1-Ocasionales; 2-<5%; 3->5%

3.1.3.3. PD-L1

Muerte programada 1 - Ligando 1, también llamado CD274 o B7-H1, ha sido identificado como el ligando para el receptor inmuno-inhibitorio PD1 y se ha demostrado que desempeñan un papel en la regulación de la respuesta inmune y la tolerancia periférica. Mediante la unión a PD1 en células T activadas y células B, PD-L1 puede inhibir las respuestas de células T en curso mediante la inducción de apoptosis y detención de la progresión del ciclo celular.

La inmunotinción fue valorada:

-PD-L1(Citoplasma Intensidad): 0-Negativo; 1-Débil; 2-Moderado; 3-Intenso

-PD-L1 (Citoplasma Porcentaje): 0-Negativo; 1-<5%; 2- 6-25%; 3-26-50%; 4->51%

-PD-L1 (Núcleo Intensidad): 0-Negativo; 1-Débil; 2-Moderado; 3-Intenso

-PD-L1 (Núcleo Porcentaje): 0-Negativo; 1-<5%; 2- 6-25%; 3-26-50%; 4- >51%

3.2. BIOLOGÍA MOLECULAR: ESTADO MUTACIONAL DE N-RAS

Se realizó el estudio de PCR y secuenciación del oncogén N-RAS de los 126 casos incluidos en el estudio. Una vez obtenido los resultados se incluyeron en la base de datos de la siguiente manera: 0- Negativo; 1-p.Q61R; 2-p.Q61K; 3-p.Q61L; 4-p.G12D.

3.2.1. PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO FIJADO EN FORMOL E INCLUIDO EN PARAFINA

En primer lugar, se realizó la extracción de ADN a partir de muestras conservadas en parafina. Para la extracción de DNA, se seleccionó el Kit QIAamp® DNA FFPE TISSUE (QIAGEN). El kit QIAamp® DNA FFPE TISSUE está optimizado para la purificación de ADN a partir de tejido fijado en formol incluido en parafina. Dicha purificación se basa en las propiedades de una membrana de sílice, contenida en una columna, que muestra afinidad por el ADN permitiendo su separación del resto de moléculas biológicas de la muestra. Además, el kit está optimizado para revertir las modificaciones producidas en las moléculas de ácidos nucleicos por el formaldehído.

El procedimiento de extracción consta de 6 etapas básicas:

1. Desparafinación con xilol.
2. Lisis o digestión con proteinasa K en condiciones desnaturalizantes.
3. Incubación a 90°C para revertir los entrecruzamientos producidas en el ADN por el formaldehído.

4. Unión del ADN a la membrana y elución del resto de moléculas orgánicas, restos de parafina y sales.

5. Lavado para eliminar contaminantes residuales.

6. Elución del ADN unido a la membrana

Material de partida: De cada uno de los casos incluidos en el estudio, se realizaron 10 cortes a 15 μ m del tejido incluido en parafina, posteriormente se hizo macrodissección seleccionando el área con mayor carga tumoral y este tejido se depositó en tubos Eppendorf de 1.5ml rotulados.

Procedimiento:

Etapa de desparafinación:

1. Se añadió 1ml de xilol. Vórtex 10 segundos para mezclar bien.
2. Se centrifugó a velocidad máxima la muestra durante 10 minutos.
3. Se retiró el sobrenadante con pipeta teniendo cuidado de no arrastrar el pellet.
4. Se añadió 1ml de etanol absoluto (el etanol es capaz de extraer los restos de xilol que queden en la muestra). Vórtex durante 10 segundos para mezclar bien.
5. Se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos.
6. Se retiró el sobrenadante con pipeta sin arrastrar el pellet. Se dió un spin y se retiró el etanol residual con ayuda de una pipeta más fina.
7. Se incubaron las muestras a 37° C durante 5 minutos o hasta conseguir la completa evaporación del etanol

Etapa de digestión o lisis:

8. Se resuspendió el pellet en 180µl de Buffer ATL. Se añadieron 20µl de proteinasa K, suministrada con el kit, y se mezcló con vórtex durante 10 segundos.

9. Se incubaron a 56°C las muestras durante 1 hora.

10. Posteriormente, se incubaron las muestras a 90°C 1 hora (la incubación a 90°C en Buffer ATL revierte parcialmente las modificaciones del ADN causadas por el formaldehído; un incremento en el tiempo o temperatura de incubación puede resultar en una mayor fragmentación del ADN).

Etapas de extracción:

11. Se Añadieron 200µl de Buffer AL y se mezclaron con vórtex. Posteriormente, se añadieron 200µl de etanol absoluto y se mezclaron de nuevo con vórtex. Se centrifugó un par de segundos para recoger las posibles gotas que se hubieran podido quedar por el tubo.

12. Se añadieron 200 µl de etanol y se agitó para homogenizar la muestra. La muestra obtenida de estos tubos se depositó en las columnas de microcentrifugación procedentes del kit previamente rotuladas. Se Incubó durante 1 minuto. Luego se Centrifugó a 13.200 revoluciones por minuto (rpm) 1 minuto (El ADN genómico queda retenido por la membrana de la columna).

13. Se transfirió la columna a un nuevo tubo colector de 2ml (suministrado con el kit) y se descartó el tubo colector que contenía el eluido de la columna.

Etapas de lavado:

14. A continuación, se añadieron 500µl de Buffer AW1, procedente del kit y se realizó otra centrifugación a 13.200rpm durante 1 minuto. Una vez finalizada se desechó el tubo colector y se colocó uno nuevo.

15. Se añadieron 500µl de Buffer AW2 y se centrifugó a 13.200rpm durante 1 minuto.

16. Se transfirió la columna a un nuevo tubo colector de 2ml (suministrado con el kit) y se descartó el tubo colector que contenía el eluido de la columna. Se Centrifugó a velocidad máxima durante 3 minutos para secar la membrana por completo.

17. Se transfirió la columna a un Eppendorf de 1.5ml y se descartó el tubo colector que contenía el eluido de la columna.

Etapa de elución:

18. Se añadieron 200µl de Buffer ATE aplicándolo directamente en el centro de la membrana y con cuidado de no tocar con la punta de la pipeta. Se incubó durante 5 minutos para conseguir la completa hidratación de la membrana. A continuación, se centrifugó la muestra a velocidad máxima. La mezcla obtenida en esta paso sería el ADN resultante que posteriormente se utilizó para el análisis. Por último, se cuantificó la cantidad de ADN obtenido utilizando un espectrofotómetro (*Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer*) y el programa asociado ND-1000 V3.5.2. (Figura 12) Como blanco se utilizó Buffer ATE procedente del mismo kit de extracción para el ADN.

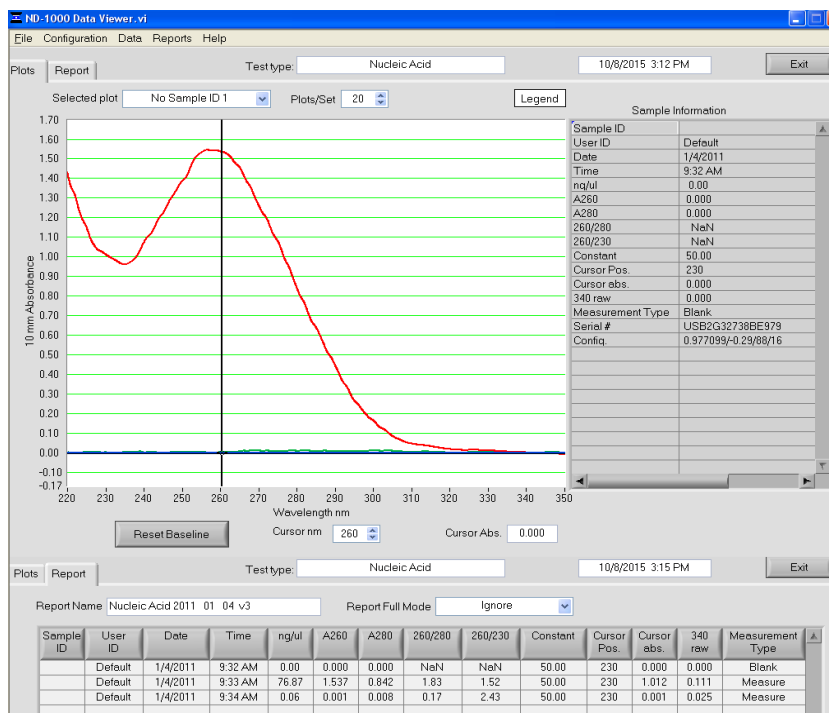


Figura 12. Cuantificación ADN (Nanodrop ND-1000)

3.2.2. PCR Y SECUENCIACIÓN N-RAS

Se realizó amplificación por PCR de los exones 2 (codones 12 y 13) y 3 (codones 60 y 61), del oncogén N-RAS humano para el diagnóstico genético de las mutaciones por secuenciación Sanger.

Técnica de la PCR

La PCR es una técnica utilizada en biología molecular que permite amplificar el ADN desde pocas copias a millones mediante los primers que delimitan la zona a amplificar. Esta reacción se produce gracias a la tecnología de los termocicladores que se programan para alternar temperaturas elevadas y frías para desnaturalizar el ADN y activar la acción de la enzima. Por esta razón en las reacciones de PCR se utiliza una ADN polimerasa llamada Taq polimerasa que es una enzima termoestable que resiste los cambios de temperatura.

Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l.

En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizadas) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable (figura 13.A). En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde (figura 13.B). En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria (figura 13.C).

Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que

es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

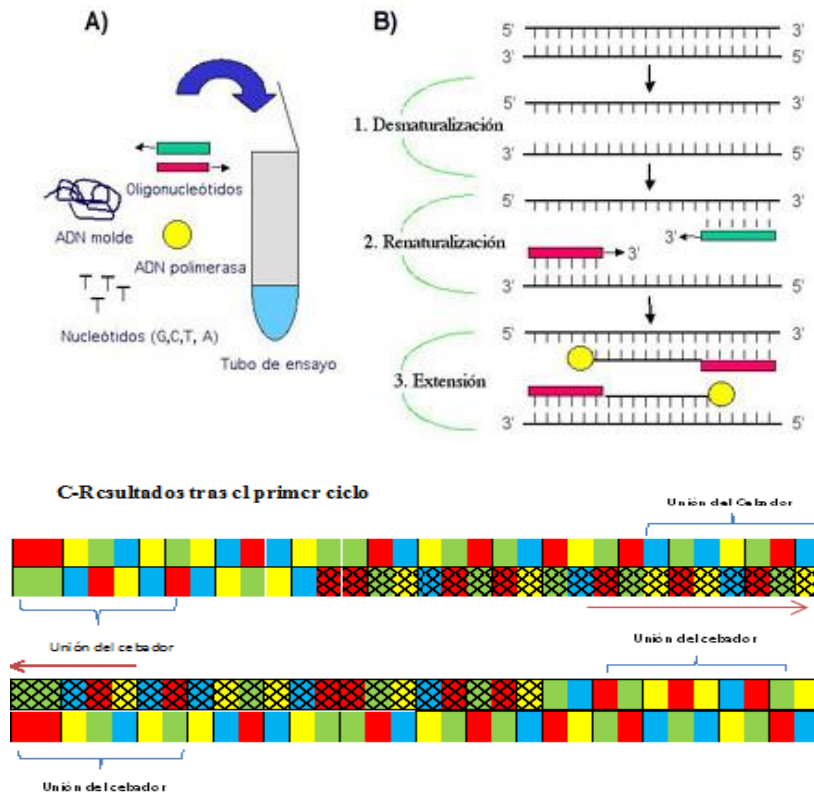


Figura 13. Representación esquemática: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR. B. Fases de la PCR. C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación.

Protocolo PCR

1) Para empezar, se descongeló, agitó y centrifugó brevemente todos los reactivos (excepto la enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase).

2) Preparación Mix PCRs (Tabla 2). Se elaboró una mezcla de reacción para 10 reacciones de 50 μ L. Se preparó la mezcla maestra de PCR (master mix), como se describe a continuación (Tabla 2) adicionando los primers específicos y el ADN en estudio.

Tabla 2. Mezcla de reacción para una PCR de 25 μ l

Componentes	Lumen por reacción individualV (μ L)	Volumen por 10 Reacciones (Master Mix I)
10X PCR Gold Buffer	2.5	25
25 mM MgCl ₂	1.5	15
dNTP Mix	0.5	5
AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD (0.5U)	0.25	2.5
Primer Forward	1	10
Primer Reverse	1	10
Nuclease-Free Water	-	
DNA	-	
Volumen final	25	250

3) Se repartieron 49 μ L del Mix en cada tubo de PCR de 0,2 mL. Se añadió 1 μ L del aislado de ADN en cada tubo. El tubo 10, no contenía ADN y fue utilizado como control negativo frente a contaminación.

4) Se colocaron los tubos en el termociclador y se arrancó el ciclo correspondiente de PCR de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para las amplificaciones de exones 2 y 3

Condiciones Para N-RAS exón 2 (codones 12 y 13) y exón 3 (codones 60 y 61)

T °C	Tiempo	Ciclos
95	10' (desnaturalización inicial)	
94	45'' (desnaturalización)	
58	45'' (Cebado)	40
72	45'' (elongación)	
72	10'(extensión final)	

5) Verificación PCR. El producto de PCR se verificó mediante la carga de una alícuota de la reacción en un gel de agarosa al 2% (Protocolo electroforesis en gel de agarosa, ver página 80). Se comprobó el tamaño esperado, su intensidad, la ausencia de amplificaciones inespecíficas, la ausencia de dímeros de cebadores y la ausencia de señal en las reacciones utilizadas como control negativo (sin ADN molde) (Tabla 4).

Gen	Secuencia	Referencia	Producto amplificado
NRAS12.D F	GAACCAAATGGA AGGTCACA	Helen Davies Mutations of the BRAF gene in human cancer Carta Nature 2002 v417	331pb
NRAS12.D R	TGGGTAAAGATG ATCCGACA	Helen Davies Mutations of the BRAF gene in human cancer Carta Nature 2002 v417	
NRAS61.D F	GGTGAAACCTGTT TGTTGGA	Victoria Greene. J Invest Dermatol 2009	272 pb
NRAS61.D R	AACCTAAAACCA ACTCTTCCCA	Victoria Greene. J Invest Dermatol 2009	

Tabla 4. Secuenciación de primers para amplificación de N-RAS Codones 12 y 61

Secuenciación de productos de PCR

1. Purificación de los productos de PCR

Una vez verificada la obtención del producto de PCR, cualquier resto de nucleótidos no consumidos y/o cebadores remanentes en el producto de PCR debe ser eliminado, al poder interferir en la posterior reacción de secuenciación.

Purificación enzimática de los productos de PCR:

La ExoSAP-IT (Amersham-Biosciences) es un producto que utiliza dos enzimas hidrolíticas, Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina para eliminar esos restos no deseados y preparar el producto de PCR para el siguiente paso. A pesar de que el protocolo comercial indica volúmenes mayores, las siguientes indicaciones han dado resultados satisfactorios reduciéndolo en gran medida. Se añadió 1 µL de

ExoSAP-IT (USB) en 5 μL de producto de PCR. Luego, en un termociclador se incubó a 37°C durante 15 min., seguido de un paso final a 80°C durante 15 minutos.

2. Reacción de secuenciación

Una vez el producto de PCR estaba purificado, se llevó a cabo la reacción de secuenciación en la que las bases nucleotídicas, de las secuencias amplificadas, quedan marcadas con fluorescencia para poder ser detectadas en el secuenciador. Para ello se utilizó el kit comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), el cual ofrece resultados satisfactorios. A pesar de que el fabricante indica un protocolo a seguir con unos volúmenes específicos que aseguran el correcto funcionamiento de los reactivos, la modificación de los protocolos del fabricante funciona siempre correctamente, consiguiendo reducir drásticamente el volumen del Big Dye

3. Se mezclaron los siguientes componentes por cada reacción de 10 μL (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes de Big Dye por cada reacción de 10 μL

Componentes	Cantidad
5X	1,5
BigDye	0,5
Template	1-5 μL
Primer (3,2 pmoles/ μL)	1
Agua	-
Volumen final	10

4. Cycle Sequencing: Se programó el perfil de PCR en el termociclador (Tabla 6):

Tabla 6. Temperaturas y tiempos empleados en la reacción de secuenciación.

BIG DYE		
T °C	Tiempo	Ciclos
95	1' (desnaturalización inicial)	
96	10'' (desnaturalización)	36
55	5'' (hibridación)	
60	4' (elongación)	

5. Purificación de la reacción de secuenciación.

La purificación del producto obtenido en la reacción de secuenciación se realizó utilizando el kit comercial Performa® DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio).

Se procesaron los productos de PCR pasándolos por columnas de purificación. Se centrifugaron las columnas de purificación (Edge Biosystems) durante 3 minutos a 850g (3000 rpm) y se descartó el eluido. A continuación, se puso la columna en un nuevo tubo tipo Eppendorf. Con una pipeta se puso todo el producto de secuenciación (10 µl) dentro de la columna y se volvió a centrifugar durante 3 minutos a 3000 rpm

6. Secuenciación y análisis de las secuencias en la base de datos

En nuestro caso, el servicio de Anatomía Patológica dispone de un secuenciador automático Applied Biosystem 310, que se basa en el método de secuenciación de Sanger. Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación se analizaron en base a la información existente en la base de datos Ensembl. A la información sobre las secuencias del gen NRAS se accede con el número ENSG00000213281.

[Ensembl genome browser 78: Homo sapiens - Summary - Transcript: NRAS-001 \(ENST00000369535\)](#)

Gene: NRAS ENSG00000213281

Description: neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:7989]

Location: [Chromosome 1: 115,247,090-115,259,515](#) reverse strand.

INSDC coordinates: chromosome:GRCh37:CM000663.1:115247090:115259515:1

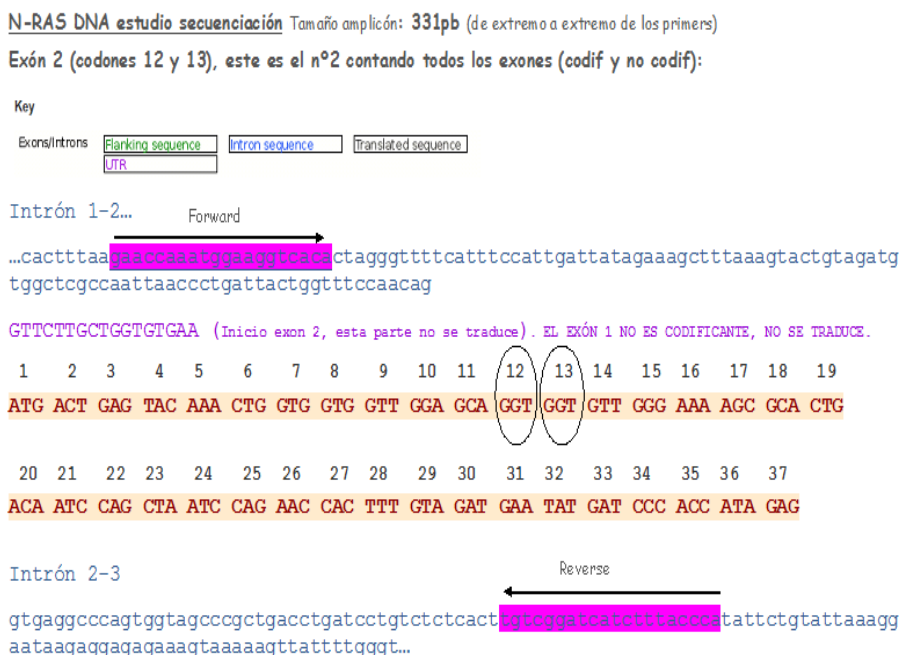


Figura 14. Estudio de secuenciación N-RAS Exón 2 (codones 12 y 13)

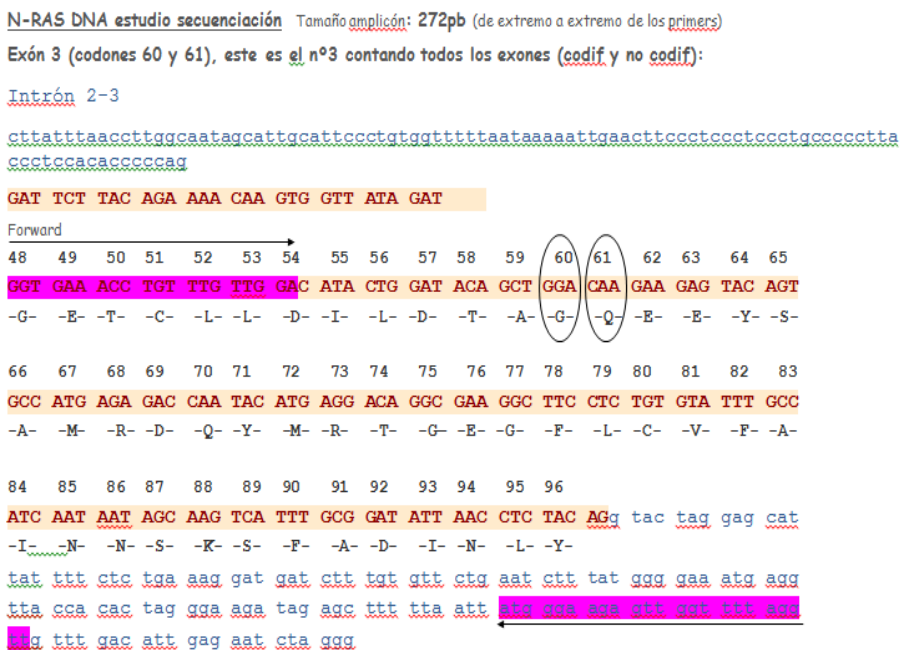


Figura 15. Estudio de secuenciación N-RAS Exón 3 (codones 60 y 61)

Protocolo de electroforesis en gel de agarosa

El objetivo es la separación de los fragmentos de distinto tamaño de ADN en un gel de agarosa, en el que dichos fragmentos migrarán a diferente velocidad según su peso molecular al ser sometidos a una corriente eléctrica.

Procedimiento

1. Se prepararon las bandejas de electroforesis, colocando los peines en los sitios indicados.
2. Se Mezclaron 2 g de agarosa con 100 mL de TBE 0.5X en un frasco Erlenmeyer limpio y se calentaron en microondas agitando de vez en cuando la mezcla hasta conseguir que toda la agarosa se hubiera disuelto.
3. Se retiró la mezcla y se dejó enfriar para posteriormente añadir 8 μ l de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) para teñir el gel.
4. A continuación, se vertió la mezcla en la bandeja de electroforesis empezando en una esquina sin dejar burbujas.
5. Se dejó solidificar el gel, y se colocó la bandeja en un lugar seguro para que no se contaminara.

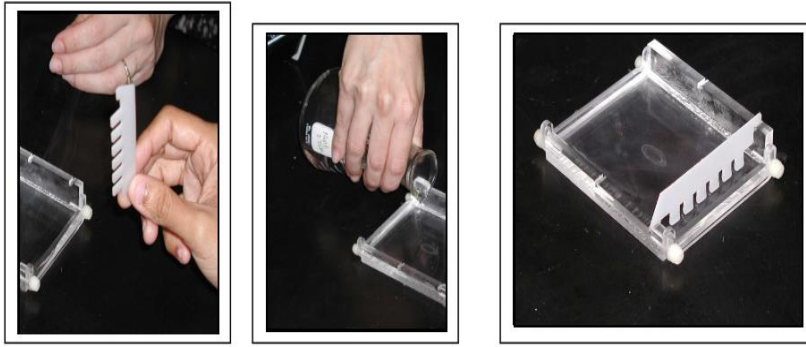


Figura 16. Preparación del gel de agarosa

Electroforesis

Procedimiento

1. Se retiraron los peines del soporte del gel y se colocó el gel en la cubeta de electroforesis.
2. Se aplicaron 4 μl del tampón de carga en un trozo de parafilm y se mezclaron con 10 μl de la muestra preparada. Nota: El tinte (loading buffer) que se utiliza contiene bromofenol azul y glicerol. El bromofenol azul es un colorante que se usa para observar el avance el ADN, y el glicerol le da peso a la muestra evitando así que ésta se salga del pocillo.
3. Se añadió tampón de electroforesis TBE a la cubeta, de forma que cubriera bien el gel de agarosa.
4. Con una micropipeta, cuidadosamente se aplicaron 8 μl de marcador de pesos moleculares en el primer pocillo. Para las demás muestras, se colocaron 14 μL en los pocillos siguientes.
5. Se tapó la cubeta de electroforesis y se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación.

6. Se programó la fuente a 120 voltios, empezando a correr la electroforesis durante 30-45 minutos.

7. Una vez acabada la electroforesis se visualizaron los fragmentos de DNA mediante luz UV y se realizó una fotografía de la imagen (Figura 17).

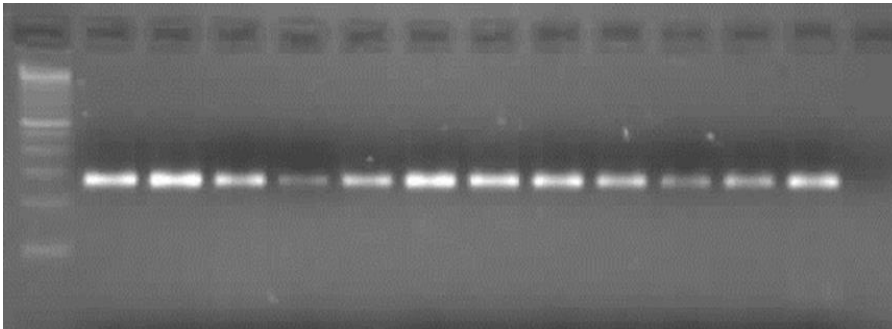


Figura 17. Imagen de la PCR. N-RAS codón 12

Análisis estadístico:

Los datos se analizaron empleando el sistema de análisis SPSS para Windows versión 22 (SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU).

Estadística descriptiva:

Procedimientos empleados para organizar presentar y sintetizar los datos de una manera científica y lógica, y resumir conjuntos de observaciones en forma cuantitativa. El resumen de los datos puede hacerse mediante tablas, gráficos o valores numéricos. Los conjuntos de datos que contienen observaciones de más de una variable permiten estudiar la relación o asociación que existe entre ellas.

Estadística de inferencia:

La Estadística inferencial o inductiva plantea y resuelve el problema de establecer previsiones y conclusiones generales sobre una población a partir de los resultados obtenidos de una muestra; trabaja con los datos que le proporciona la estadística

descriptiva. Los modelos estadísticos actúan de puente entre lo observado (muestra) y lo desconocido (población). Su construcción y estudio está basado en el cálculo de probabilidades, contrastes de hipótesis y estimación de intervalos de confianza.

Comprende las denominadas “pruebas paramétricas”, en las que la población estudiada sigue una distribución normal, y las pruebas “no paramétricas”, que no son aplicables cuando la población que se desea analizar es demasiado pequeña, o la información disponible es insuficiente para comprobar la hipótesis de trabajo. Estas últimas pruebas permiten extrapolar los resultados de la muestra a la población total que es objeto del análisis.

La asociación entre una variable continua u ordinal y otra categórica de tipo dicotómico se estudió con la U de Mann-Whitney. Si esta segunda variable tenía más de dos categorías, se aplicó el test de Kruskal-Wallis. Si la probabilidad asociada al estadístico de contraste era menor que el nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula a dicho nivel de significancia.

Para analizar la magnitud de la asociación entre las variables consideradas como probables predictoras y la presencia o ausencia de metástasis y expresión de PD-L1 y PD-1 se utilizó la regresión logística no condicional, expresándose los resultados en forma de oportunidad relativa (OR), “odds ratio” en terminología anglosajona, e intervalo de confianza (IC 95%).

La selección del mejor modelo se realizó mediante un método automático paso a paso (“stepwise”).

Regresión de Cox: Se empleó para poder determinar no sólo la relación entre la tasa de supervivencia y el tiempo, sino también la posible relación con diferentes variables registradas para cada sujeto. Permite, por tanto, calcular la tasa de mortalidad como una función del tiempo y de las variables pronóstico. En el modelo de Cox se analiza el producto de dos componentes, uno que depende del tiempo y otro que depende de las variables pronóstico o covariantes, y no depende el tiempo.

Análisis de la proporción libre de enfermedad mediante el método de supervivencia de Kaplan-Meier: Permite estudiar el comportamiento de la supervivencia. Esta metodología permite contrastar si los diferentes niveles de un determinado factor producen o no, curvas de supervivencia significativamente distintas, utilizando el test del logaritmo del rango. La elección de esta prueba concreta está fundamentada en un elevado número de casos censurados (libres de enfermedad o vivos). La variable “intervalo libre de enfermedad” se definió como el tiempo total, expresado en meses, que transcurren desde el diagnóstico del tumor hasta que el paciente presenta un evento de recurrencia, en otro caso, hasta el último control de seguimiento que constata que el paciente permanece vivo. La curva de supervivencia representa la posibilidad de que un paciente permanezca libre de enfermedad un determinado tiempo tras el diagnóstico.

El nivel de significancia empleado en todos los análisis ha sido de 5% ($p < 0.05$). Cualquier valor de probabilidad inferior a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS CASOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

El estudio incluyó una muestra de 126 casos diagnosticados consecutivamente de melanoma primario cutáneo entre los años 2001 y 2014, en el Hospital Quirón de Torrevieja.

A continuación se detalla el análisis descriptivo de las características anatómicas y clínicas de todos los casos objeto del estudio.

La Tabla 7, presenta las diferentes características clínicas que se tuvieron en cuenta en la población a estudio. Se evidencia en la distribución por sexo que la prevalencia en varones fue discretamente superior (56%) frente a las mujeres (44%) (Figura 18). En la variable edad, se observó que el grupo etario comprendido entre 65-79 años es el mayoritario (40%), seguido del grupo de pacientes con edades entre 50 y 64 años (35%); los pacientes con una edad entre 20 y 34 años al momento del diagnóstico, fueron minoritarios (3%) (Figura 19).

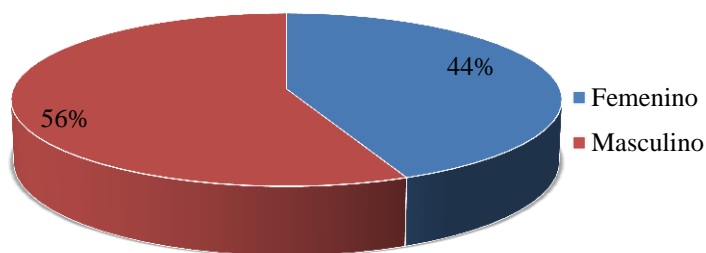


Figura 18. Distribución de la muestra por sexo

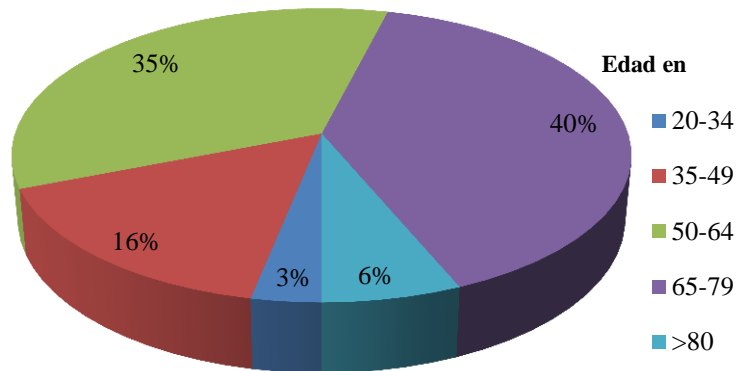


Figura 19. Distribución de la muestra por edad

Por otra parte, la localización más frecuente de melanoma primario cutáneo fue el tronco (48%), seguido de la extremidad inferior y cabeza y cuello, ambas con un 21%, y por último, la extremidad superior (8%). En un 2% de casos no se pudo determinar con certeza la localización del melanoma primario (Figura 20)

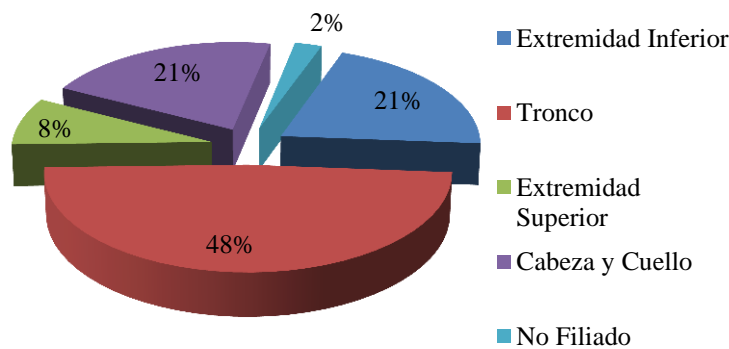


Figura 20. Distribución de la muestra por sitio anatómico

Tabla 7. Datos clínicos de la muestra

Sexo	n	Porcentaje
Femenino	55	44%
Masculino	71	56%
Edad		
20-34 años	4	3%
35-49 años	20	16%
50-64 años	44	35%
65-79 años	50	40%
>80 años	8	6%
Sitio Anatómico		
Extremidad Inferior	26	21%
Tronco	61	48%
Extremidad Superior	10	8%
Cabeza y Cuello	26	21%
No Filiado	3	2%

En las Tablas 8 y 9, se presentan los resultados correspondientes a las variables histológicas estudiadas en la muestra.

La muestra estudiada incluyó casos de melanoma cutáneo primario sin ningún criterio restrictivo respecto al índice de Breslow, si bien la mayoría (52%) se encontraba entre 1,0 y 4,0 mm de espesor. Es de destacar por tanto que nuestra serie prácticamente la mitad (48%) de los casos correspondía a melanomas delgados (Breslow \leq 1,0 mm) (Figura 21).

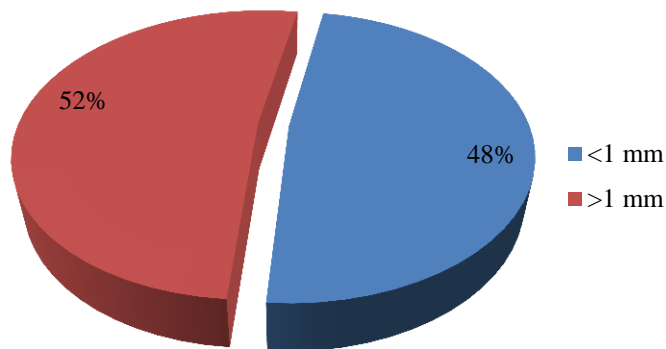


Figura 21. Distribución de la muestra por índice de Breslow

El 81% de los tumores fueron invasores (Figura 22). En cuanto al tipo histológico, la mayoría correspondieron a los tipos de melanoma de extensión superficial (42%), de nodular (39%) y de tipo léntigo maligno (19%) (Figura 23).

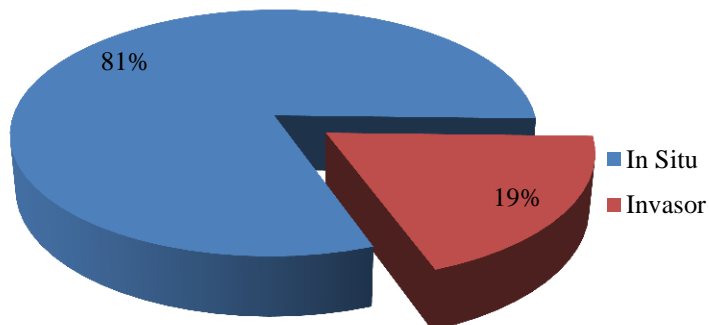


Figura 22. Distribución de la muestra por presencia o ausencia de invasión

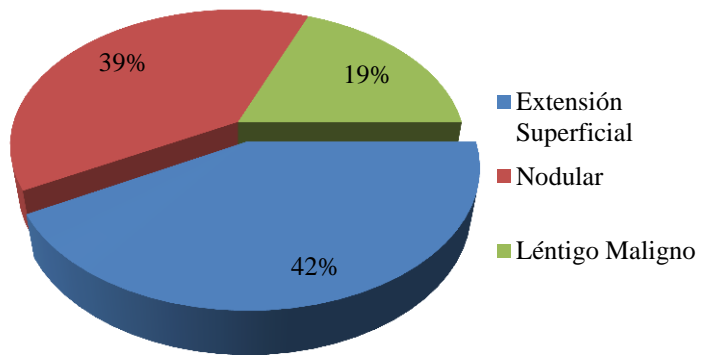


Figura 23. Distribución de la muestra por tipo histológico

Una minoría presentaban ulceración (25%), invasión vascular (16%), invasión perineural (5%) y signos de regresión (10%) (Figuras 24 a 27).

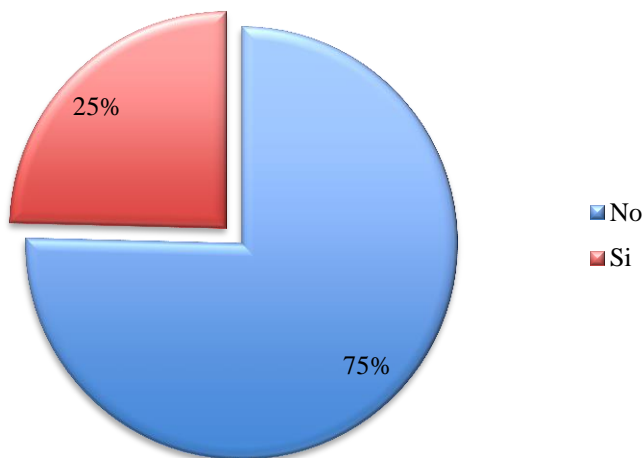


Figura 24. Distribución de la muestra por ulceración

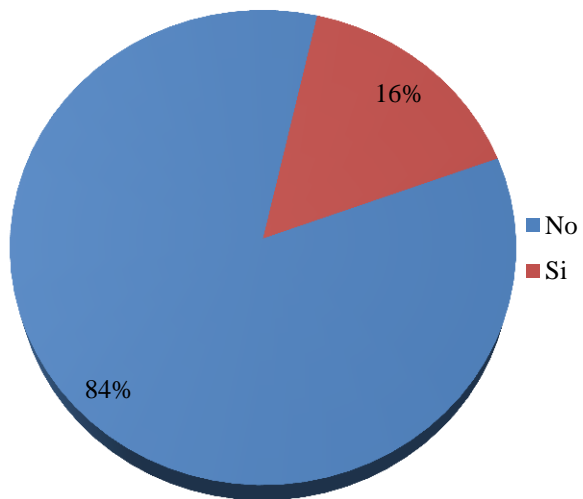


Figura 25. Distribución de la muestra por invasión vascular

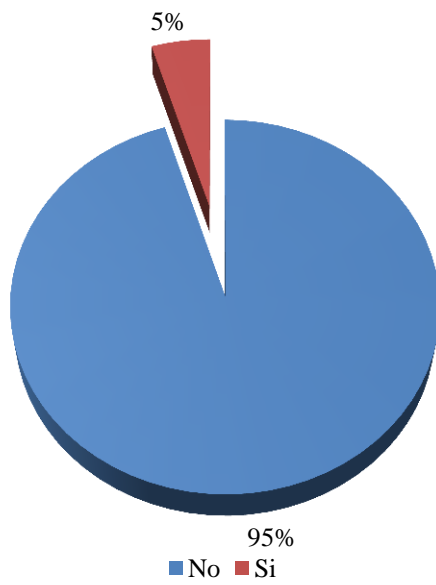


Figura 26. Distribución de la muestra por invasión perineural

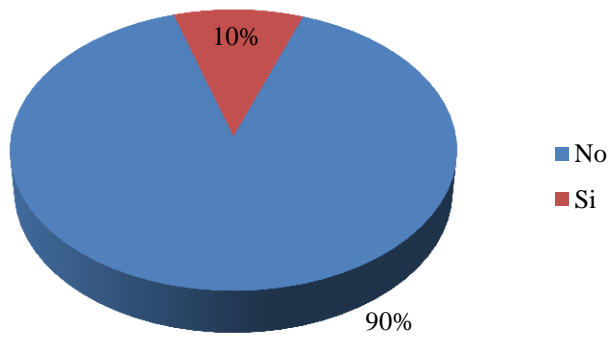


Figura 27. Distribución de la muestra por regresión

Así mismo, se encontró un 11% de casos con lesiones melanocíticas asociadas: nevus melanocítico común 7%, nevus congénito 2% y nevus displásico 2% (Figura 28).

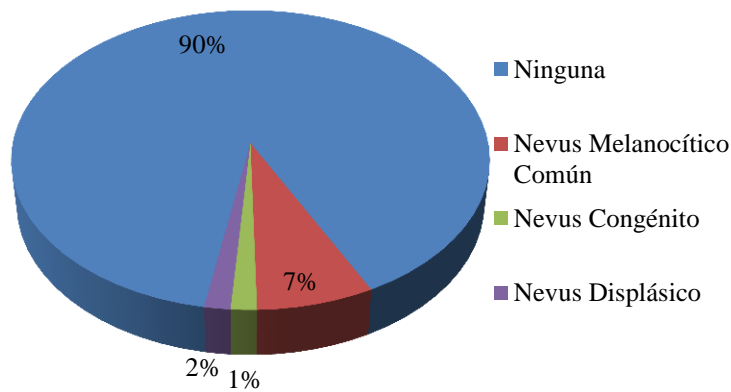


Figura 28. Distribución de la muestra por lesión melanocítica asociada

Tabla 8. Características histológicas I

Melanoma	n	Porcentaje
In Situ	24	19%
Invasor	102	81%
Tipo Histológico		
Extensión Superficial	53	42%
Nodular	49	39%
Léntigo Maligno	24	19%

TABLA 9. Características histológicas II

Tipo Celular	n	Porcentaje
Epitelioide	97	77%
Fusocelular	9	7%
Spitzoide	6	5%
Globoide/Balonizado	14	11%
Breslow		
≤1 mm	61	48%
>1 mm	65	52%
Ulceración		
No	95	75%
Si	31	25%
Mitosis/mm²		
<1	68	54%
>1	58	46%
Infiltrado Linfocitario Tumoral (TIL)		
Ausente	19	15%
Discontinuo	87	69%
Denso	20	16%
Regresión		
No	113	90%
Si	13	10%
Invasión Vascular		
No	106	84%
Si	20	16%
Invasión Perineural		
No	120	95%
Si	6	5%
Elastosis Solar		
No	62	49%
Si	64	51%
Lesión Melanocítica Asociada		
Ninguna	113	90%
Nevus Melanocítico Común	9	7%
Nevus Congénito	2	2%
Nevus Displásico	2	2%

En lo referente a la evolución clínica de los pacientes de nuestro estudio (Tabla 10), se observó la presencia de recaída local en un 13% de pacientes (Figura 29).

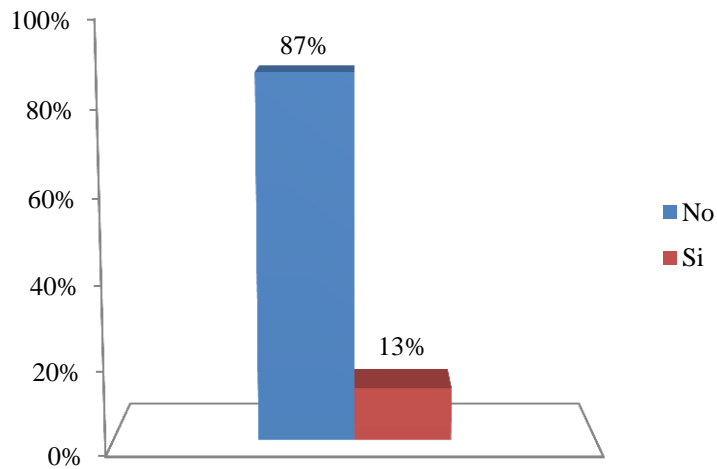


Figura 29. Distribución de la muestra por recaída local

En cuanto a las metástasis, las metástasis en tránsito se desarrollaron en el 25% de los casos, las ganglionares regionales en el 33%, y las metástasis a distancia en el 17%. En estas últimas evidenciamos que el sitio más común de metástasis fue a cerebro (45%), seguidas de pulmón, hueso y partes blandas (36%, 14% y 5%, respectivamente) (Figura 30).

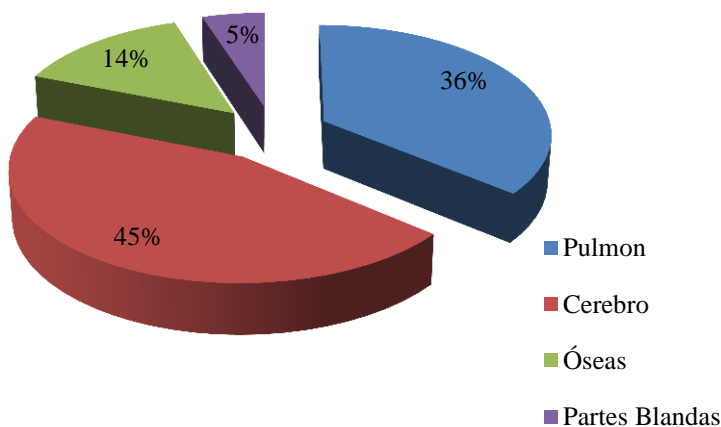


Figura 30. Distribución de la muestra por sitio de metástasis a distancia

Tabla 10. Variables de evolución clínica de la muestra

Variable	n	Porcentaje
Metástasis en Transito		
No	94	75%
Si	32	25%
Metástasis Ganglionar		
No	85	67%
Si	42	33%
Metástasis a Distancia		
No	104	83%
Si	22	17%
Óseas	3	14%
Partes Blandas	1	5%
Pulmón	8	36%
Cerebro	10	45%
Recaída Local		
No	110	87%
Si	16	13%
Éxito		
No	104	83%
Si	22	17%

Verificando al tiempo de supervivencia y los intervalos libres de enfermedad o de progresión tumoral (Tabla 11), se observó una mediana de 49 meses de supervivencia específica del tumor en la serie de casos, de 47 meses para el intervalo libre de metástasis a distancia, de 36 meses para el intervalo libre de metástasis ganglionar, de 42 meses para el intervalo de metástasis en tránsito, y de 44 meses para el intervalo libre de recaída local.

Tabla 11. Tiempo de supervivencia específica de tumor e intervalo libre de enfermedad (expresado en meses)

Variable	n	Mínimo	Máximo	Mediana
Metástasis a distancia	126	0	202	47
Metástasis ganglionar	126	0	203	36
Metástasis en tránsito	126	0	201	42
Recaída local	126	0	203	44

n: Número de casos

4.2 ESTUDIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.2.1.-ANÁLISIS DEL ESTADO MUTACIONAL DEL ONCOGÉN N-RAS

En el estudio del estado mutacional del oncogén N-RAS, se encontraron un total de 27 casos con mutación N-RAS de los 126 de la muestra, de estos, 23 casos (18%) , presentaron una mutación Q61 (p.Q61R: 14 casos; p.Q61K: 6 casos: y p.Q61L: 3 casos:) y 3 casos (3%) tenían presente la mutación p.G12D, (Figuras 31 y 32)

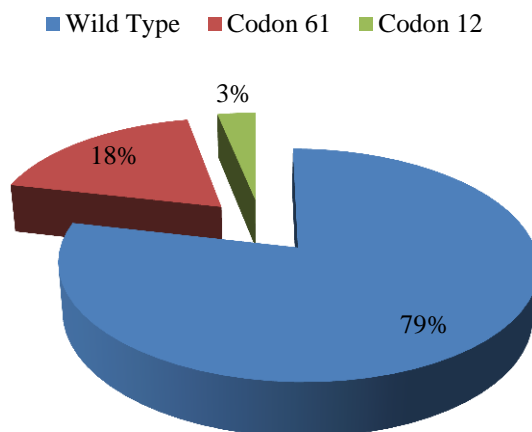


Figura 31. Distribución de la muestra por estado mutacional N-RAS

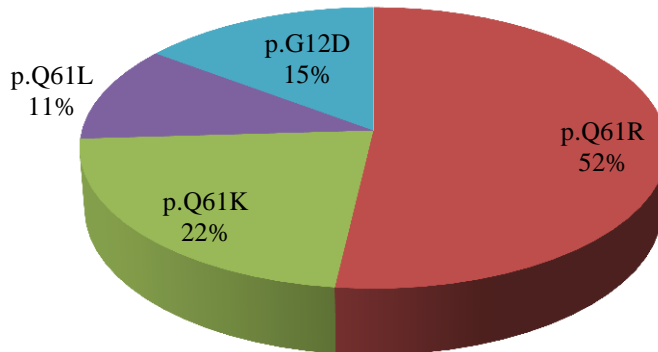


Figura 32. Distribución de la muestra por tipo de mutación N-RAS

A continuación en las figuras 33, 35, 37 y 39 se muestra la secuenciación de algunos de los casos de nuestra serie, con la presencia de mutación N-RAS en los codones 61 y 12 (p.Q61R, p.Q61K, p.Q61L y p.G12D) en cada una se encuentra resaltado mediante un ovalo el sitio de la mutación, junto a cada uno de las secuencias podemos observar la respectiva imagen histológica con tinción de Hematoxilina & Eosina (Figuras 34, 36, 38 y 40) (imagen en 10x).

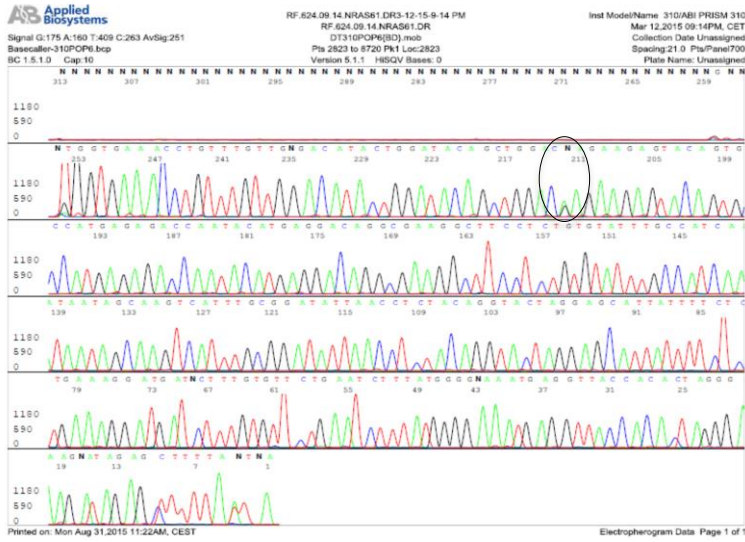


Figura 33. Resultado de la secuenciación. Mutación N-RAS p.Q61R

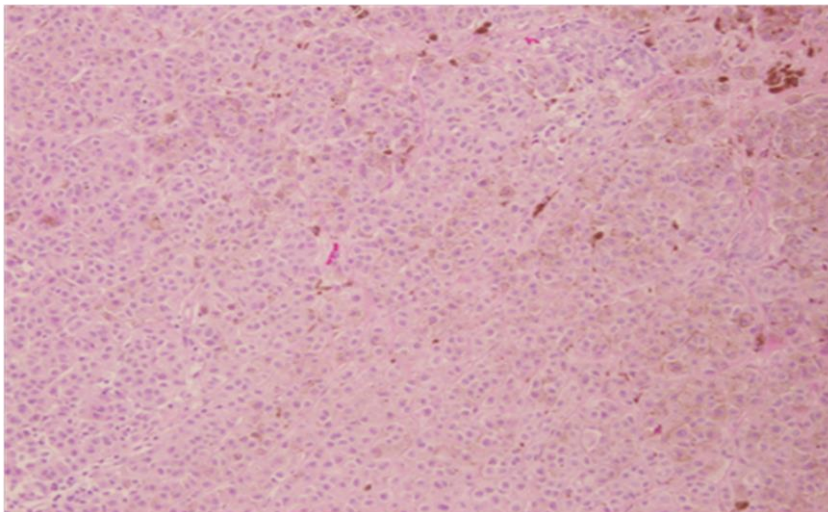


Figura 34. Imagen histológica de melanoma con mutación N-RAS p.Q61R

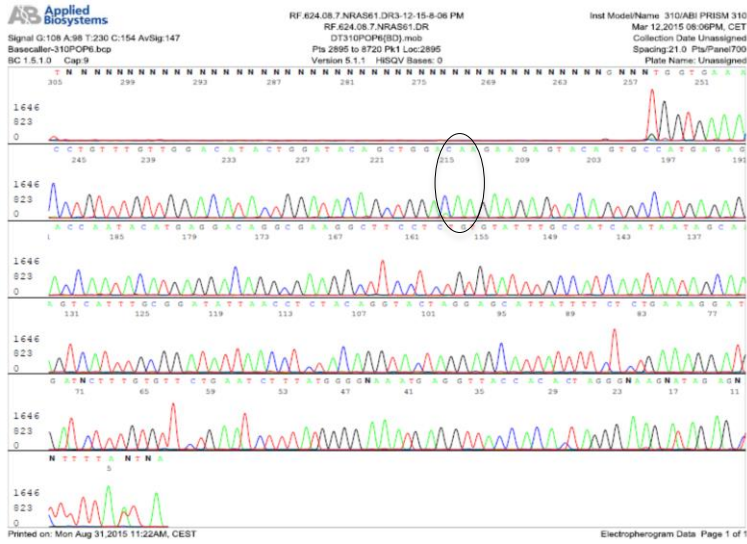


Figura 35. Resultado de la secuencia. Mutación N-RAS p.Q61K

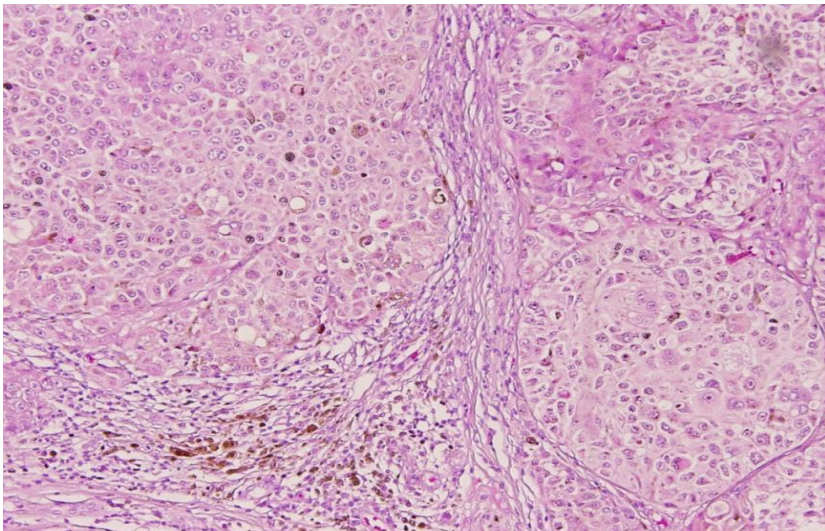


Figura 36. Imagen histológica de melanoma con mutación N-RAS p.Q61K

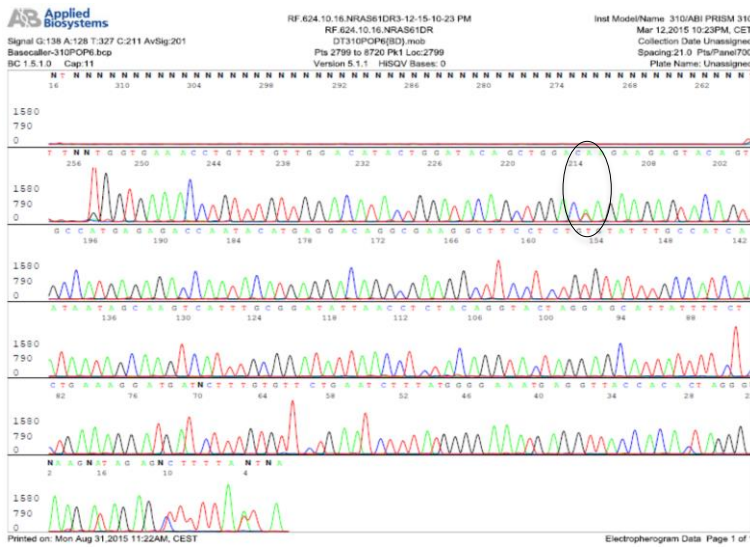


Figura 37. Resultado de la secuenciación mutación N-RAS p.Q61L

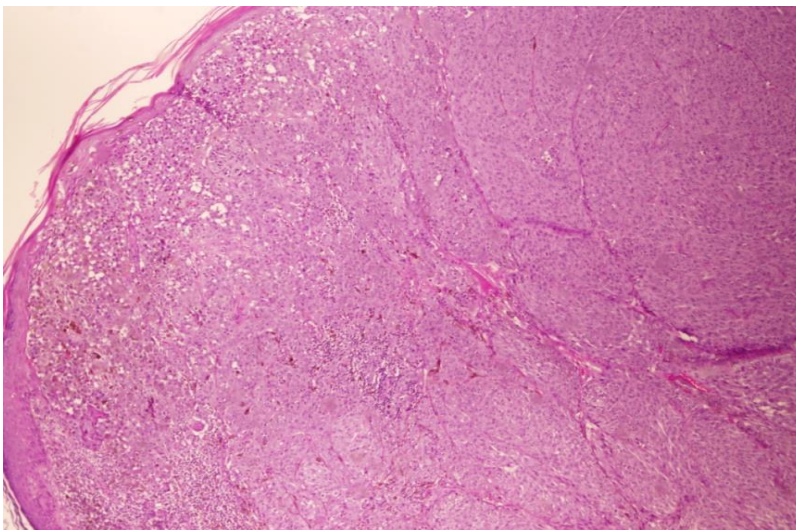
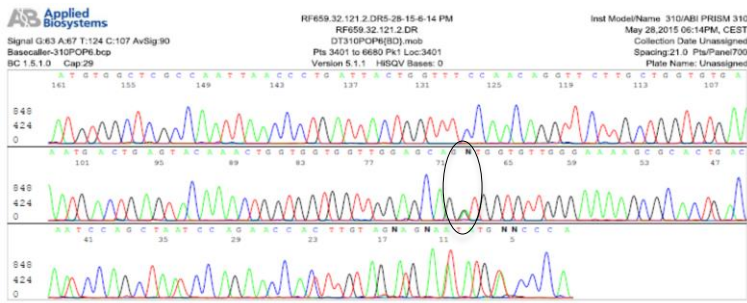


Figura 38. Imagen histológica de melanoma con mutación N-RAS p.Q61L



Printed on: Mon Aug 31, 2015 12:17PM, CEST Electrotherogram Data Page 1 of 1

Figura 39. Resultado de la secuenciación mutación N-RAS p.G12D

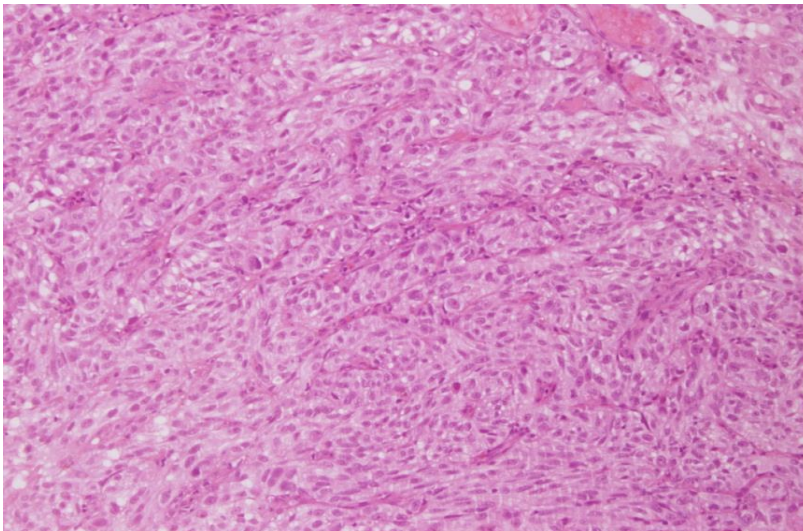


Figura 40. Imagen histológica melanoma con mutación N-RAS p.G12D

4.2.1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS MELANOMAS QUE PRESENTARON MUTACIÓN N-RAS

En la Tabla 12 se describen los casos a estudio que presentaron mutación del oncogén N-RAS. La localización más frecuente de los melanomas con la mutación N-RAS fue: tronco (44%), seguido de cabeza y cuello (19%), extremidad inferior (15%) y extremidad superior (11%), y el 11% restante correspondían a casos de localización no filiada (Figura 41).

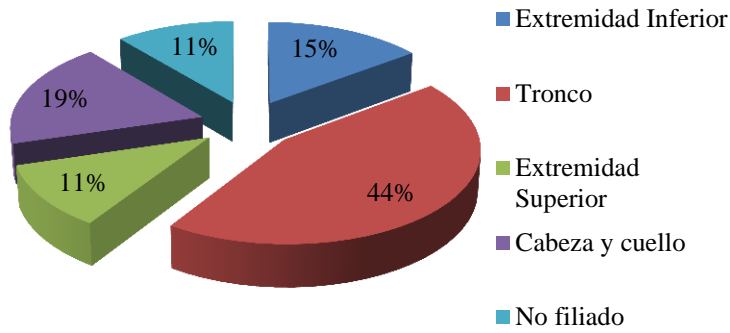


FIGURA 41. Distribución de la mutación N-RAS por sitio anatómico

En cuanto al tipo histológico, el melanoma nodular fue el que más presentó la mutación en nuestra serie (55%), en segunda instancia el melanoma de tipo extensión superficial (30%) y por último el melanoma de tipo léntigo maligno (15%) (Figura 42). Por otra parte, los melanomas con un índice de Breslow > 1 mm expresaron la mutación en un 67% mientras que los melanomas con índice de Breslow ≤ 1 mm expresaron la mutación en un 33%. La mayoría de melanomas N-RAS positivo no estaba ulcerado (67%) y presentaban menos de 1 mitosis en el 48% de todos los casos analizados.

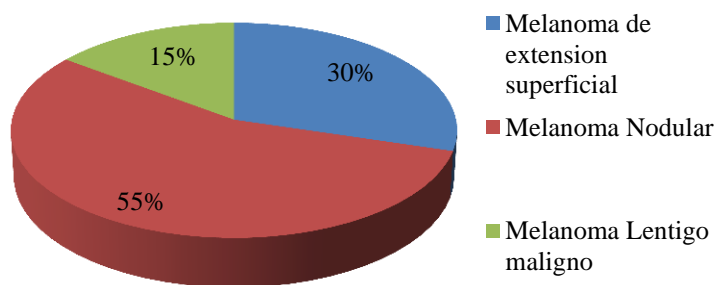


Figura 42. Distribución de la mutación N-RAS por tipo histológico

Tabla 12. Localización de melanoma primario y características histológicas de los casos que presentan mutación N-RAS

Localización	n	Frecuencia
Extremidad Inferior	4	15%
Tronco	12	44%
Extremidad Superior	3	11%
Cabeza y cuello	5	19%
No filiado	3	11%
Histología		
Extensión Superficial	8	30%
Léntigo Maligno	4	15%
Nodular	15	56%
Índice de Breslow		
≤1 mm	9	33%
>1 mm	18	67%
Ulceración		
No	18	67%
Si	9	33%
Mitosis/mm²		
<1	13	48%
>1	14	52%

4.2.1.2. CORRELACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE N-RAS CON LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

- En el estudio de prevalencia de la mutación N-RAS en relación con el sexo, se encontró que los hombres presentaban la mutación N-RAS en mayor frecuencia que las mujeres (Figura 43). La mutación N-RAS p.Q61R fue la más común tanto en hombres como en mujeres, siendo la mutación p.Q61K la segunda en frecuencia; y en último lugar, con la misma frecuencia en hombres (7%), las mutaciones p.Q61L y p.G12D. En mujeres, la mutación p.G12D ocupa el tercer lugar en frecuencia y la mutación p.Q61L el último (Figura 44)

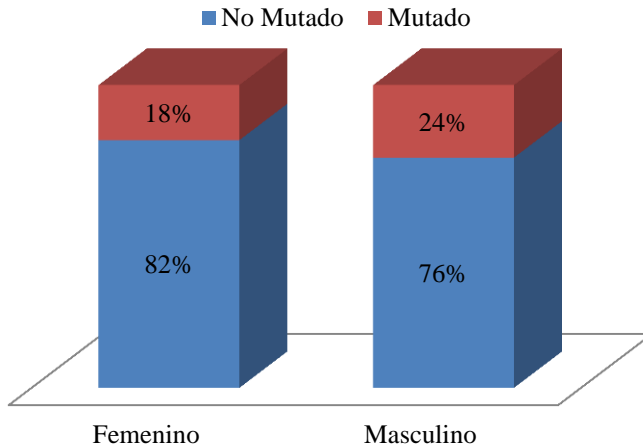


Figura 43. Prevalencia de la mutación N-RAS por sexo

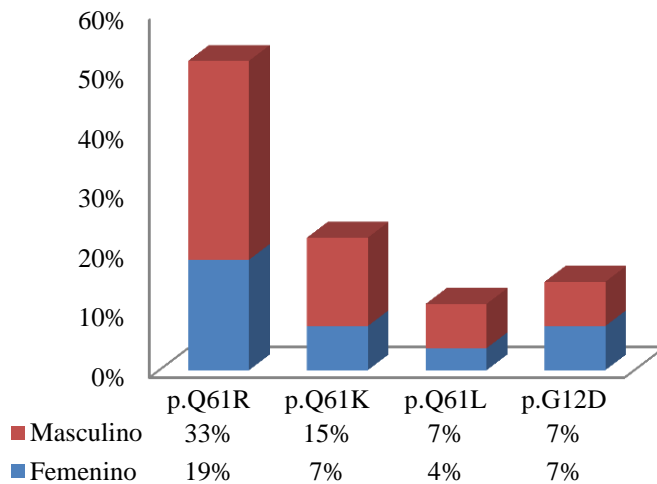


Figura 44. Distribución del tipo de mutación N-RAS por sexo

- En el estudio de correlación del estado mutacional N-RAS con la edad, se encontró que los casos que presentaban mutación p.Q61K presentaban la menor mediana de edad (59 años) y los casos que presentaban la mutación p.Q61L la mayor mediana de edad (76 años) (Tabla 13). También es evidente que la mutación no estaba presente en los casos con edades entre 20-34 años y que el mayor porcentaje de mutaciones se situaba en los sujetos con edades entre 65 – 79 años (30%) seguidos por los de 50-64 años (18%) (Figura 45).

Tabla 13. Mediana de edad por estado mutacional N-RAS

Estado Mutacional	n	Mediana-edad
Wild Type	99	61
Q61R	14	62
Q61K	6	59
Q61L	3	76
G12D	4	68

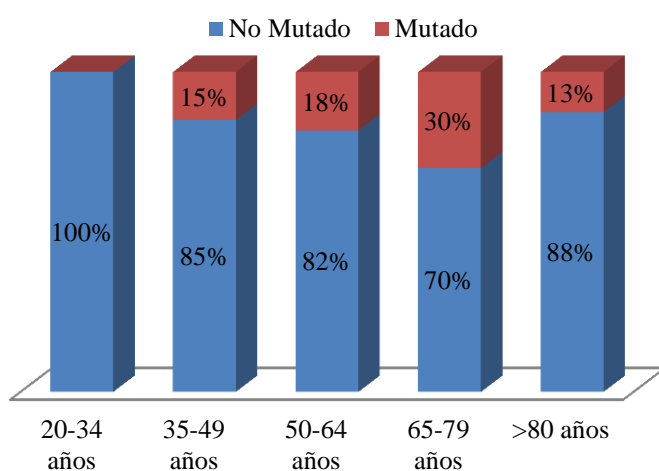


Figura 45. Prevalencia de la mutación N-RAS por edad

-En la correlación del estado mutacional N-RAS con el tipo histológico de melanoma, encontramos que la presencia de mutación N-RAS es más frecuente en el tipo histológico nodular (55%) comparado con los tipos de extensión superficial y lentigo maligno (30 y 15% respectivamente) (Figura 46). La mutación N-RAS es prevalente en 31% de los melanomas frente a un 17% y 15% del melanoma Lentigo maligno y melanoma de extensión superficial (Figura 47).

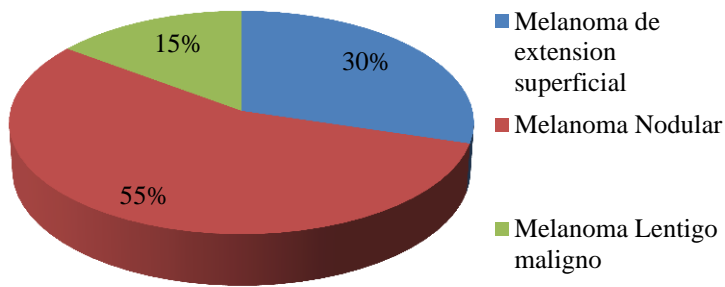


Figura 46. Distribución del tipo histológico en los casos mutados

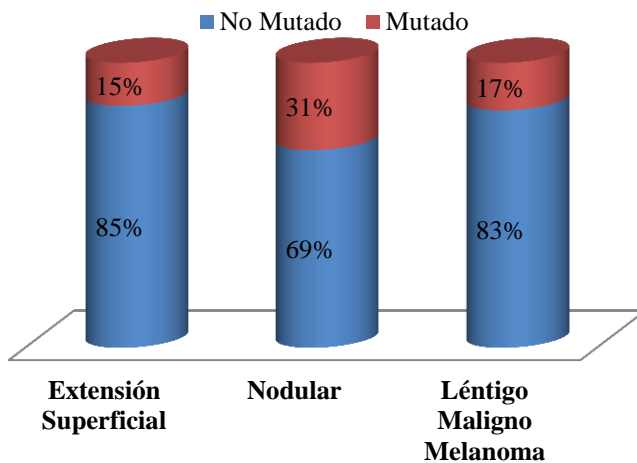


Figura 47. Prevalencia de la mutación N-RAS por tipo histológico

-En la Figura 48 se observa que un 15% de los casos que presentaban mutación positiva para N-RAS eran melanomas in situ, mientras que el 85% restante que presentaban la mutación, eran melanomas invasores. Es decir, en la muestra tenemos una prevalencia de la mutación N-RAS en los melanomas invasores del 23% frente a un 17% en los melanomas in situ (Figura 49).

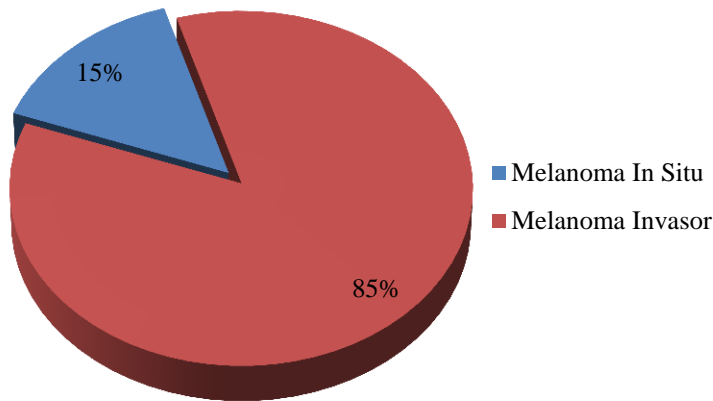


Figura 48. Distribución de la mutación N-RAS en melanoma In situ e invasores

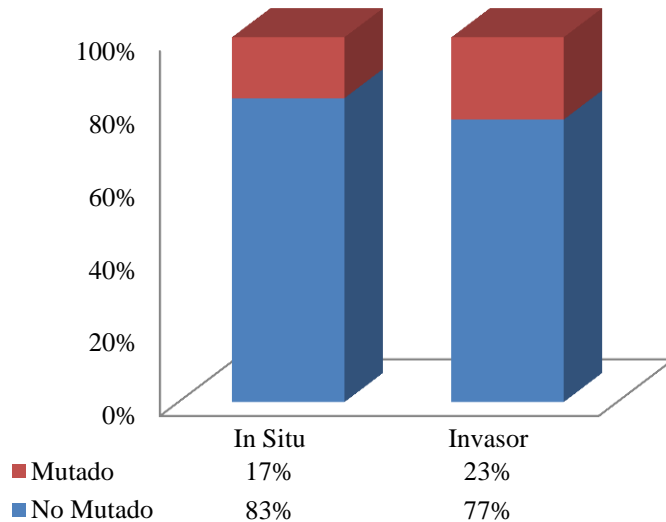


Figura 49. Prevalencia de la mutación N-RAS en melanomas In situ e invasores

4.2.1.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LA ASOCIACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE N-RAS CON LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICO-PATOLÓGICAS Y DE EVOLUCIÓN CLÍNICA.

Se realizó el análisis de todos los casos correlacionando la presencia o ausencia de mutación del oncogén N-RAS con las variables clínico-histológicas mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y no se observó asociación con ningún parámetro clínico-patológico o evolutivo (Tabla 14).

Tabla 14. Correlación de la presencia o ausencia de la mutación N-RAS con las variables histológicas y clínicas

Variable	P	Prueba
Sexo	0,732	
Edad	0,382	
Breslow	0,287	
Ulceración	0,237	
Mitosis/mm ²	0,569	
Regresión	0,388	
Invasión vascular	0,447	
Invasión perineural	0,192	
Elastosis	0,757	
Tipo histológico	0,615	U de Mann-Whitney
Tipo Celular	0,162	
Fase de crecimiento	0,529	
Linfocitos	0,635	
Localización melanoma	0,619	
Lesión melánica asociada	0,197	
Metástasis a distancia	0,666	
Metástasis en tránsito	0,67	
Metástasis ganglionar	0,41	
Recaída local	0,711	
Éxito	0,684	

La proporción de la mutación N-RAS en el melanoma del tipo Fusocelular es de un 44% seguido por un 36% en el Globoide/Balonizado y un 19% en el Epitelioide, en el tipo celular spitzoide no se encontró prevalente la mutación (figura 50).

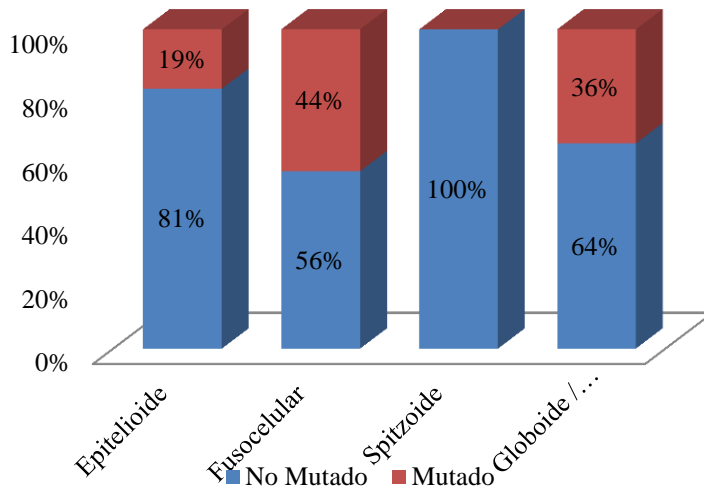


Figura 50. Prevalencia de la mutación N-RAS por tipo celular

La prevalencia de la mutación en función de su localización es de un 100% en los no filiados, un 30% en la extremidad superior, un 20% en el tronco y un 19% y 15% para cabeza y cuello y extremidad inferior respectivamente (Figura 51).

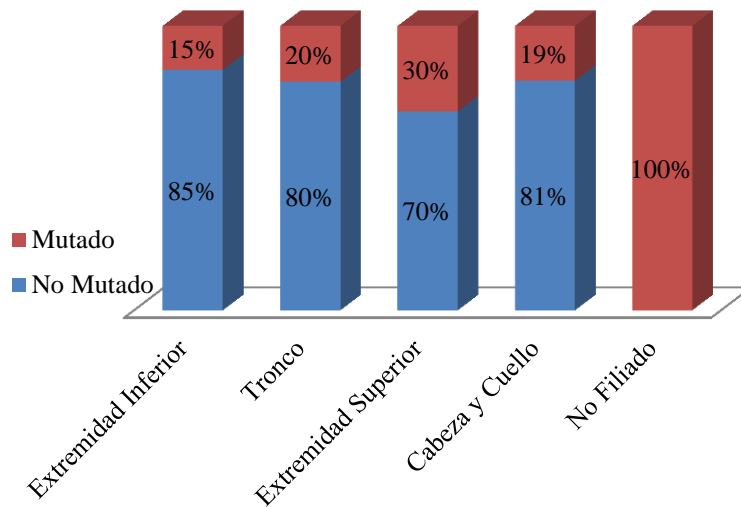


Figura 51. Prevalencia de la mutación N-RAS por localización

La proporción de la mutación N-RAS en los tumores de mayor grosor es de 28% en relación a los más delgados (Breslow ≤ 1) con un 15%; los tumores ulcerados tienen un mayor porcentaje de mutación 29% frente a los no ulcerados 19% (Figuras 52 y 53).

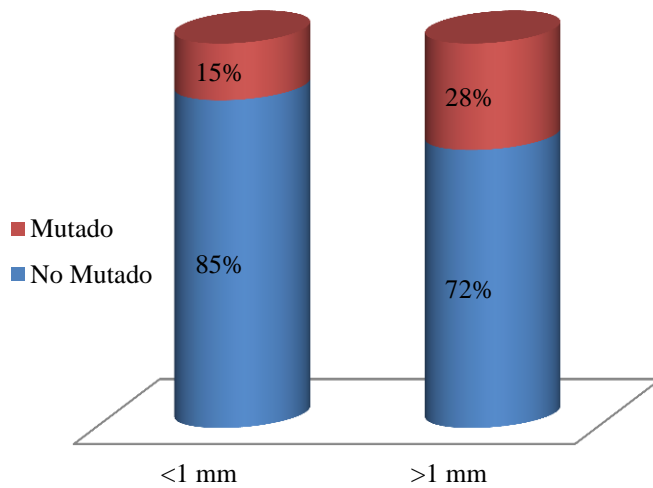


Figura 52. Prevalencia de la mutación N-RAS por índice de Breslow

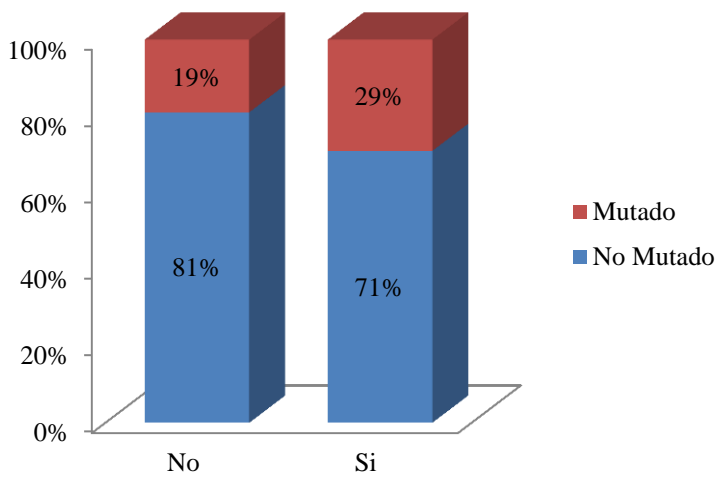


Figura 53. Prevalencia de la mutación N-RAS por ulceración

La prevalencia de la mutación en los tumores con mayor índice mitótico fue superior (24%) frente a aquellos con mitosis menores de 1 (19%); en la variable de invasión vascular la proporción fue similar en los dos grupos (20% para aquellos con invasión vascular y 22% para los que no la presentaban) y una prevalencia nula en el grupo con invasión perineural (Figuras 54 a 56).

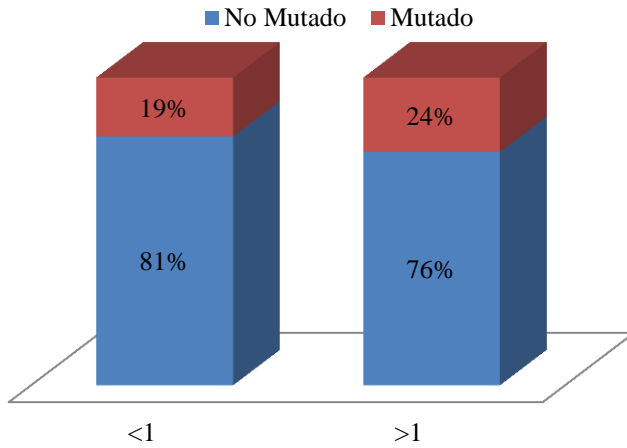


Figura 54. Prevalencia de la mutación N-RAS por mitosis

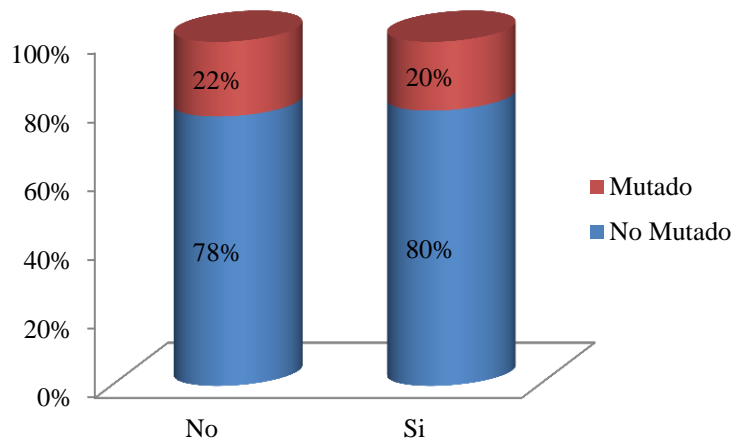


Figura 55. Prevalencia de la mutación N-RAS por invasión vascular

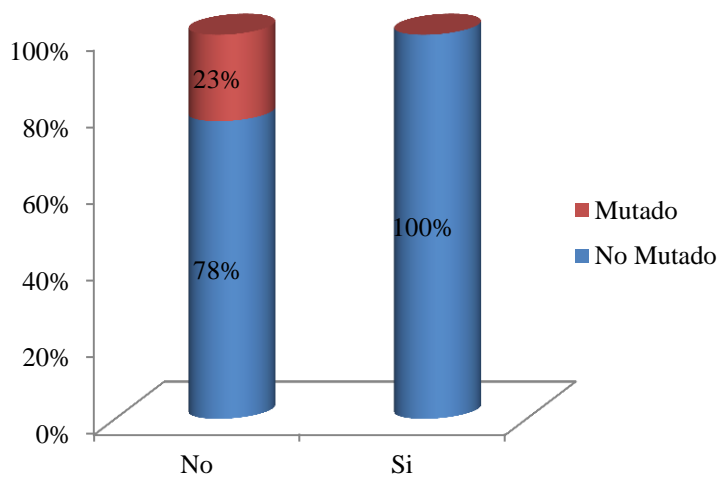


Figura 56. Prevalencia de la mutación N-RAS por invasión perineural

El mayor prevalencia de mutaciones en la variable de infiltrado linfocitario peritumoral se agruparon en el TIL de tipo discontinuo y en las que el infiltrado se encontraba ausente (24% y 21%), el porcentaje de la mutación N-RAS fue mayor en los tumores con regresión 31% frente a los que no la presentaban 20% (Figuras 57 y 58).

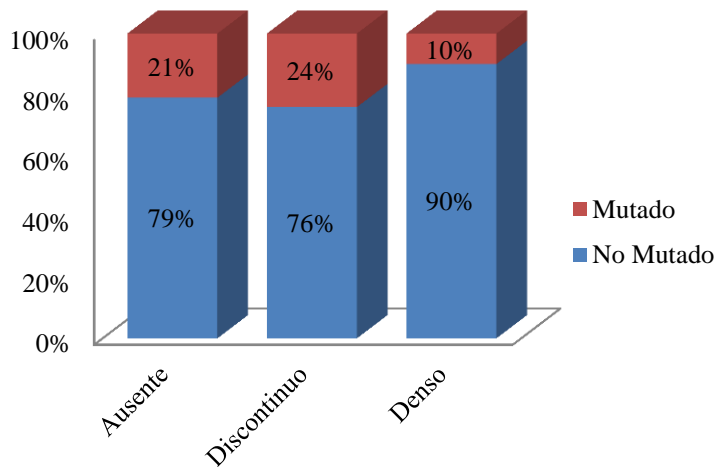


Figura 57. Prevalencia de la mutación N-RAS por infiltrado linfocitario

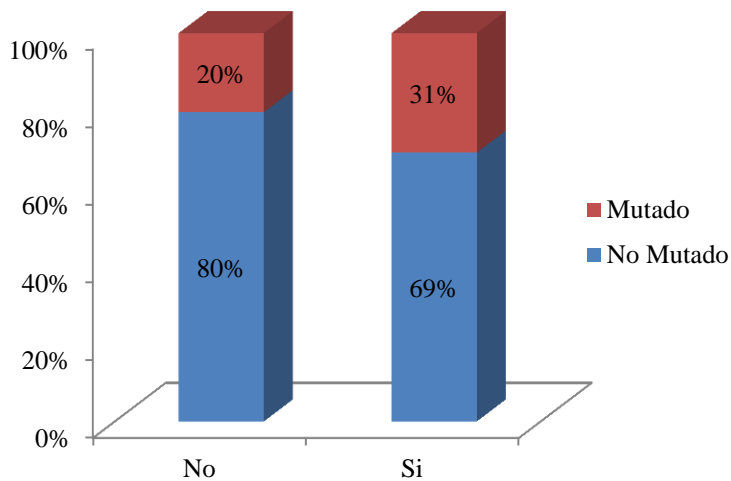


Figura 58. Prevalencia de la mutación N-RAS por regresión

La proporción de mutación en lesiones sin elastosis solar es mayor con un 24% en relación a los casos con elastosis 19%. La prevalencia de la mutación es nula en el nevus congénito y el nevus displásico y su mayor porcentaje se encuentra en los

casos sin lesiones melanocíticas asociadas 23% seguido por el nevus melanocítico común (y 11%) (Figuras 59 y 60).

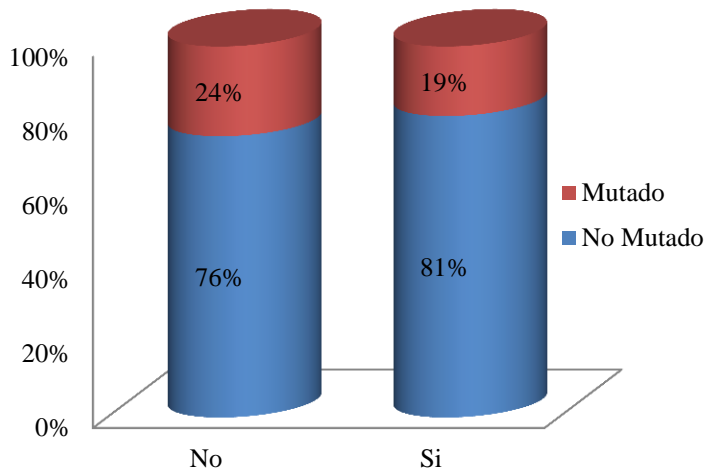


Figura 59. Prevalencia de la mutación N-RAS por elastosis solar

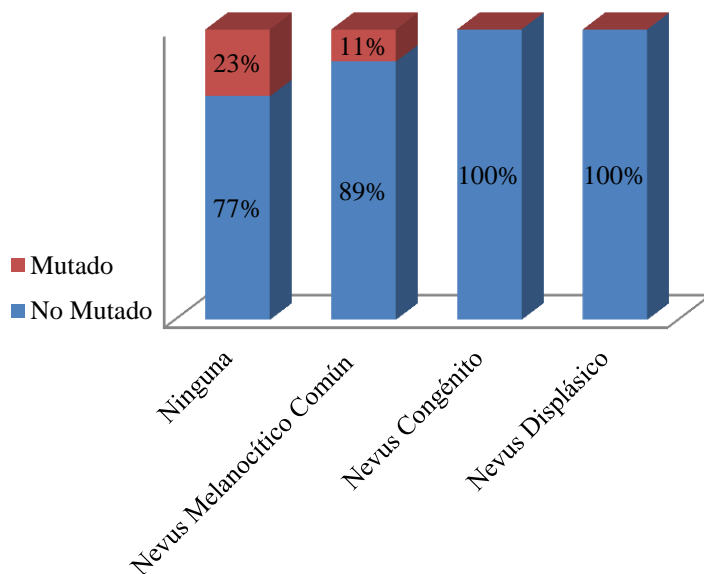


Figura 60. Prevalencia de la mutación N-RAS por lesión melanocítica asociada

Asimismo se estudió la asociación del estado mutacional, analizado en 3 grupos: no mutado, mutación Q61R y mutación distinta de la Q61R, mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Se encontró una correlación positiva entre la presencia de una mutación N-RAS distinta de la Q61R y la existencia de regresión tumoral ($p=0,023$).

4.2.2.4. -ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LA ASOCIACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE NRAS CON LA SUPERVIVENCIA Y LOS INTERVALOS LIBRES DE ENFERMEDAD LOCAL, REGIONAL Y A DISTANCIA.

-No se evidenció correlación del estado mutacional N-RAS con los distintos intervalos libres de enfermedad ni con el tiempo de supervivencia específico del tumor (Kaplan-Meier). (Figuras 61 y 62)

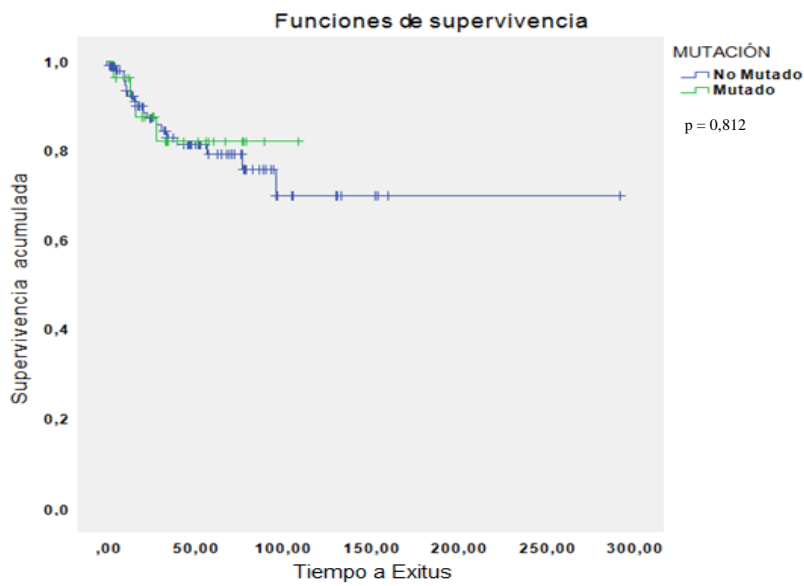


Figura 61. Tiempo de supervivencia específica del tumor

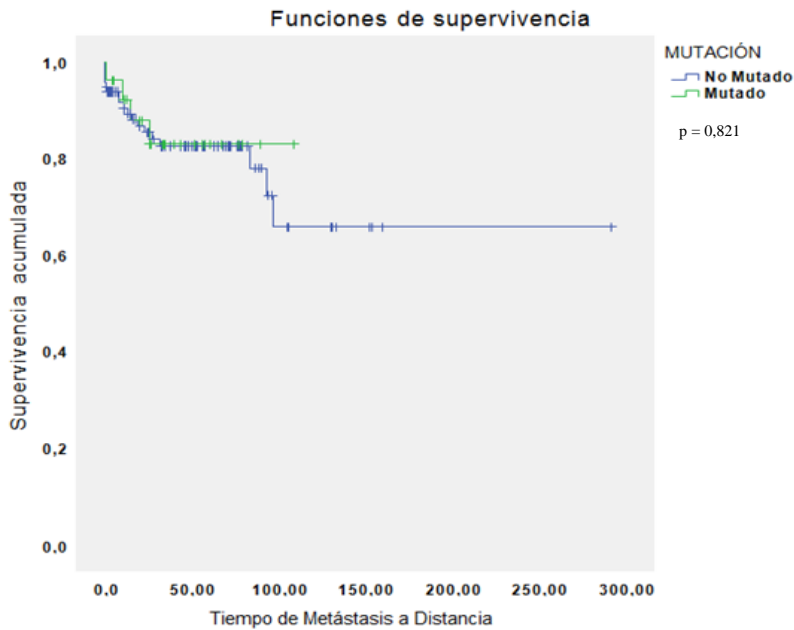


Figura 62. Intervalo libre de metástasis

4.3-ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

De los 126 casos iniciales, en el estudio inmunohistoquímico se evaluó finalmente un máximo de 119 casos y un mínimo de 87, debido a insuficiente celularidad, tumoral o linfocitaria, o una inmunotinción deficiente que impidiera una valoración fiable de los casos.

Los resultados de la expresión inmunohistoquímica para NRAS Q61R se detallan a continuación:

4.3.1 N-RAS (Q61R):

En el estudio inmunohistoquímico se encontró inmunotinción citoplasmática/membranosa de intensidad débil, moderada o intensa en 13 casos y todos ellos presentaban la mutación p.Q61R por secuenciación (Figuras 63 a). Tan solo uno de los casos que tenía la mutación p.Q61R por secuenciación no mostró inmunotinción con el anticuerpo N-RAS Q61R. Ninguno de los casos que presentó una mutación N-RAS distinta de la p.Q61R que reconoce específicamente el anticuerpo utilizado en este estudio (p.Q61K, p.Q61L y p.G12D) ni los casos no mutados, presentaron inmunorreactividad para N-RAS Q61R.

Por tanto, la especificidad del anticuerpo N-RAS Q61R en nuestra serie es del 100%, mientras que la sensibilidad es del 93%.

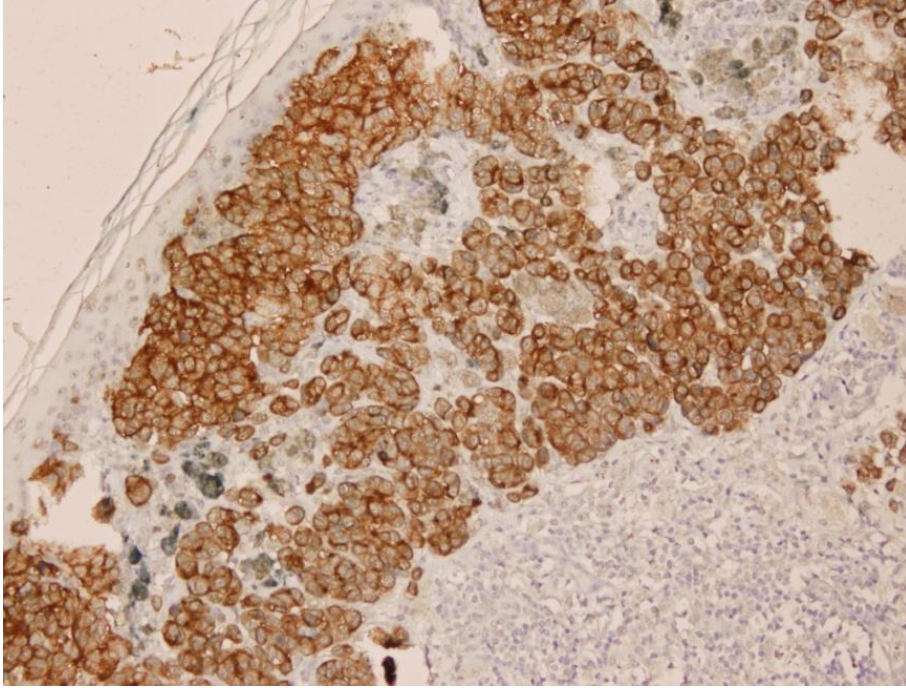


Figura 63. Expresión inmunohistoquímica N-RAS: intensidad +++

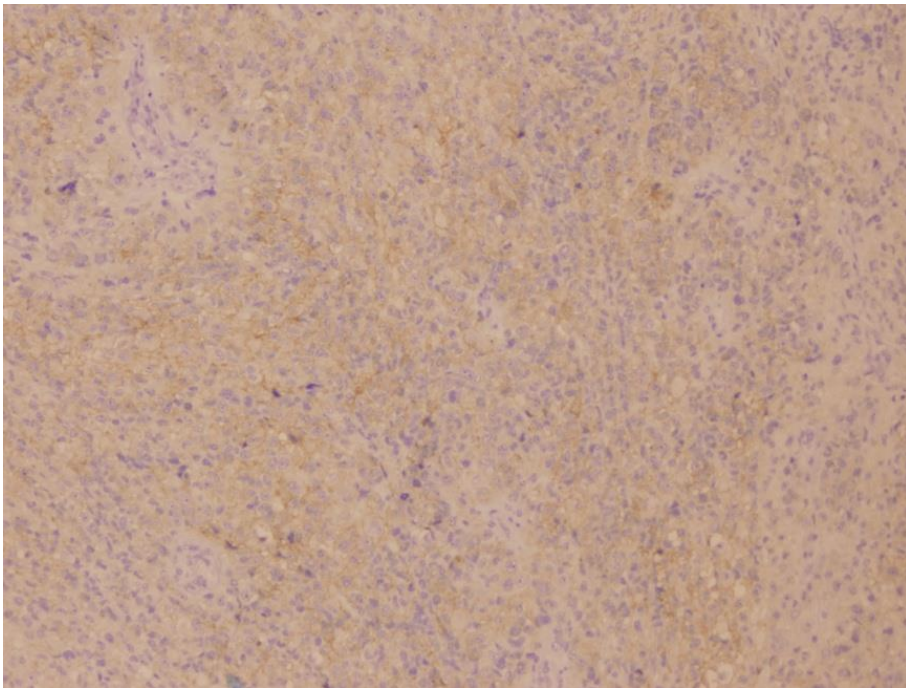


Figura 64. Expresión inmunohistoquímica N-RAS: intensidad +

4.3.2. PD-L1

Tras valorar la presencia o ausencia, intensidad y porcentaje de células con inmunotinción citoplasmática/membranosa para PD-L1, así como de la inmunotinción nuclear que encontramos en un número limitado de casos, y estudiar su correlación con los diferentes parámetros de evolución clínica, se obtuvieron los siguientes resultados:

Figuras 65 a 69 Inmunotinción citoplasmática/membranosa y nuclear para PD-L1.

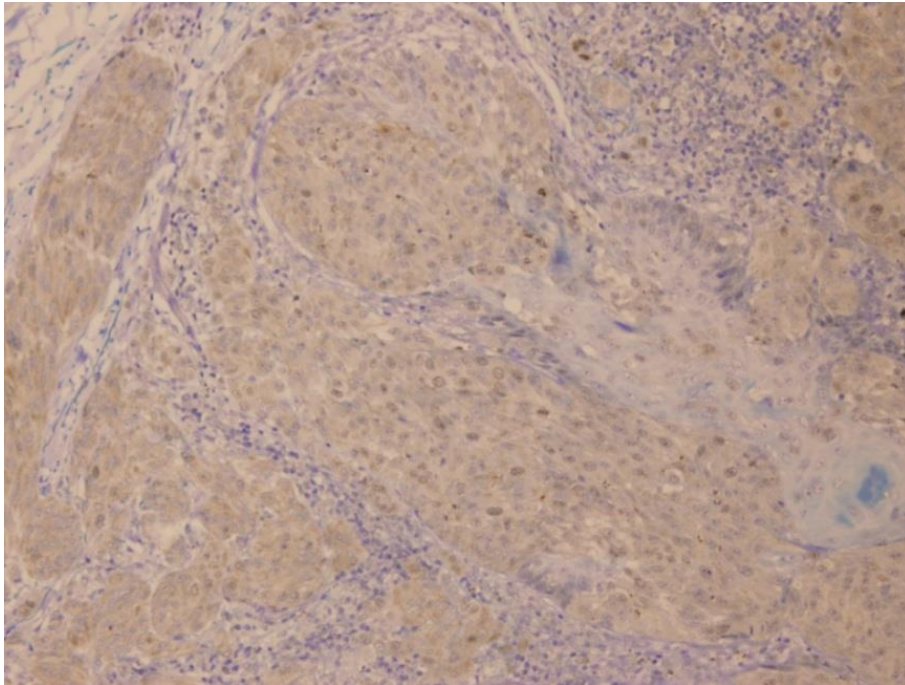


Figura 65. Inmunotinción PD-L1 citoplasmática/membranosa +

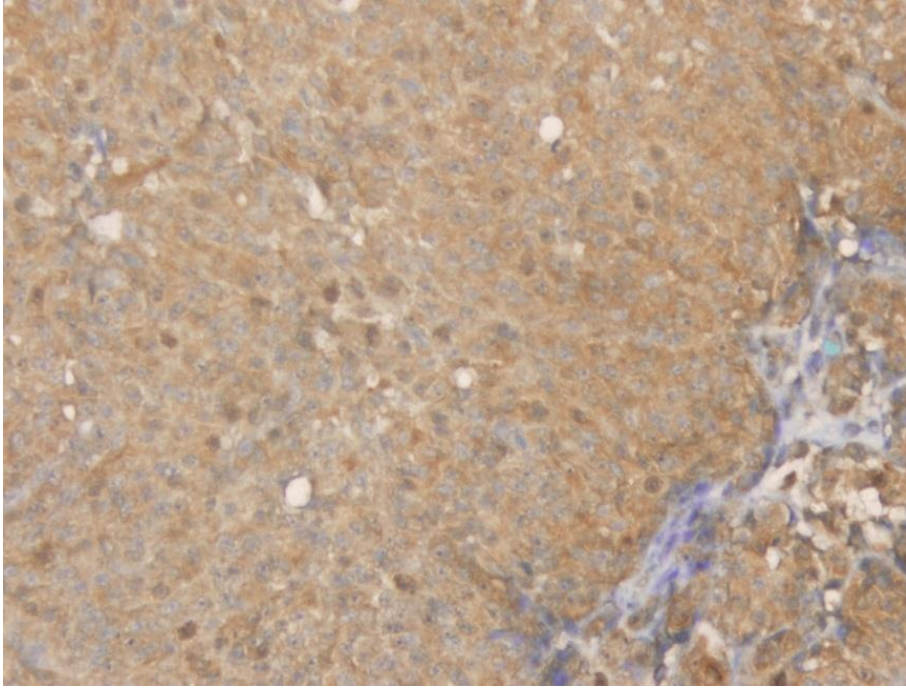


Figura 66. Inmunotinción PD-L1 citoplasmática/membranosa ++

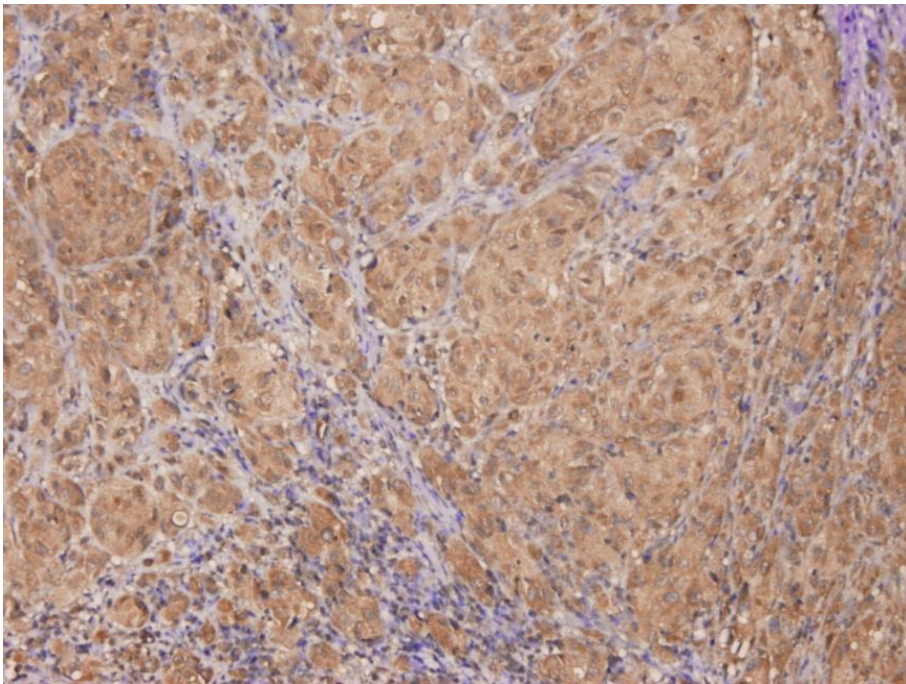


Figura 67. Inmunotinción PD-L1 Citoplasmática/membranosa +++

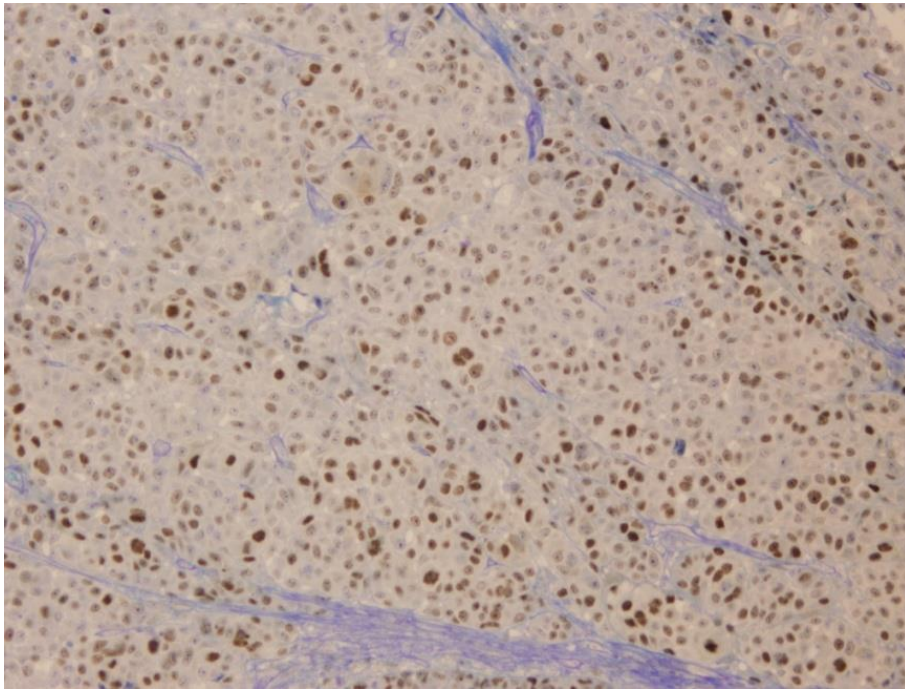


Figura 68. Inmunotinción PD-L1 nuclear ++

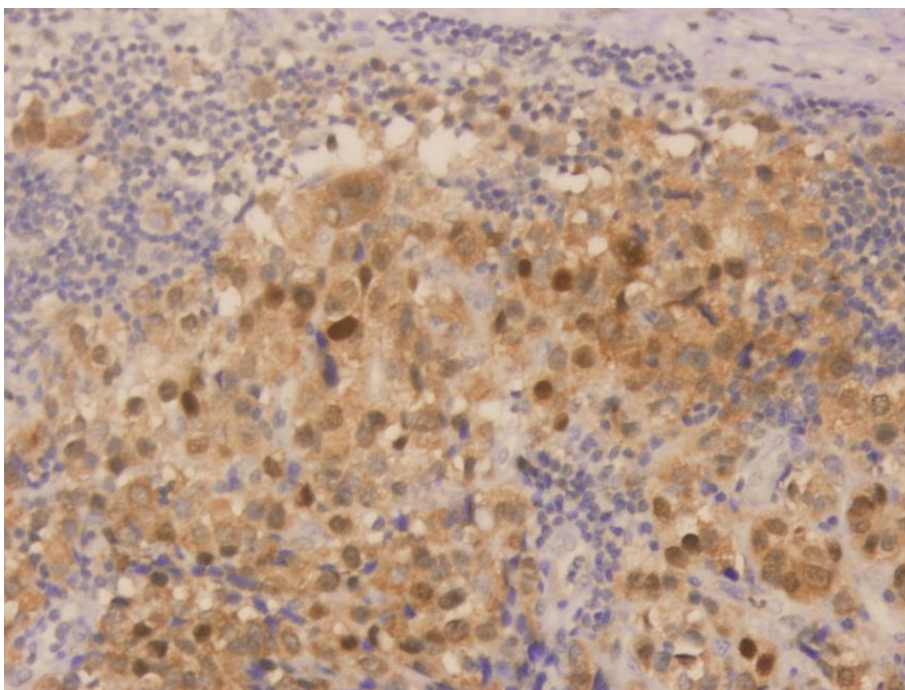


Figura 69. Inmunotinción PD-L1 nuclear +++

4.3.2.1 CORRELACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN PARA PD-L1 CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA

Mediante regresión logística se evidenciaron las siguientes asociaciones:

-Una correlación positiva entre la expresión citoplasmática/membranosa para PD-L1 y el desarrollo de metástasis en tránsito ($p=0,044$) (Tabla 15).

Tabla 15. Correlación de la inmunotinción PD-L1 con metástasis en tránsito

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-L1 Citoplasmática	119	0,044	2,346	1,022	5,387
PD-L1 Nuclear	119	0,109	2,303	0,831	6,386

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-Una asociación positiva entre inmunotinción citoplasmática/membranosa, así como la nuclear, para PD-L1 con el desarrollo de metástasis ganglionares. (Tabla 16)

Tabla 16. Correlación de la inmunotinción PD-L1 con el desarrollo de metástasis ganglionares

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-L1 Citoplasmático	119	0,003	3,358	1,513	7,45
PD-L1 Nuclear	119	0,002	5,571	1,928	16,102

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-No se observó asociación entre la expresión de PD-L1 citoplasmática/membranosa ni nuclear con la aparición de recaída tumoral. (Tabla 17)

Tabla 17. Correlación de la inmunotinción de PD-L1 con la recaída tumoral

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-L1 Citoplasmático	119	0,716	0,811	0,262	2,513
PD-L1 Nuclear	119	0,083	2,890	0,872	9,574

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-Se observó una asociación positiva entre la inmunotinción nuclear, pero no la citoplasmática/membranosa, para PD-L1 con el desarrollo de metástasis a distancia (p=0,003). (Tabla 18)

Tabla 18. Correlación de la inmunotinción de PD-L1 con el desarrollo de metástasis a distancia

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-L1 Citoplasmático	119	0,114	2,129	0,833	5,441
PD-L1 Nuclear	119	0,03	3,306	1,121	9,751

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-No se observó asociación entre la expresión de PD-L1 citoplasmática/membranosa, ni nuclear, con la mortalidad específica por melanoma (Tabla 19).

Tabla 19. Correlación de la inmunotinción PD-L1 con éxitus

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-L1 Citoplasmático	119	0,272	1,693	0,661	4,333
PD-L1 Nuclear	119	0,117	2,423	0,802	7,318

n: Número de casos

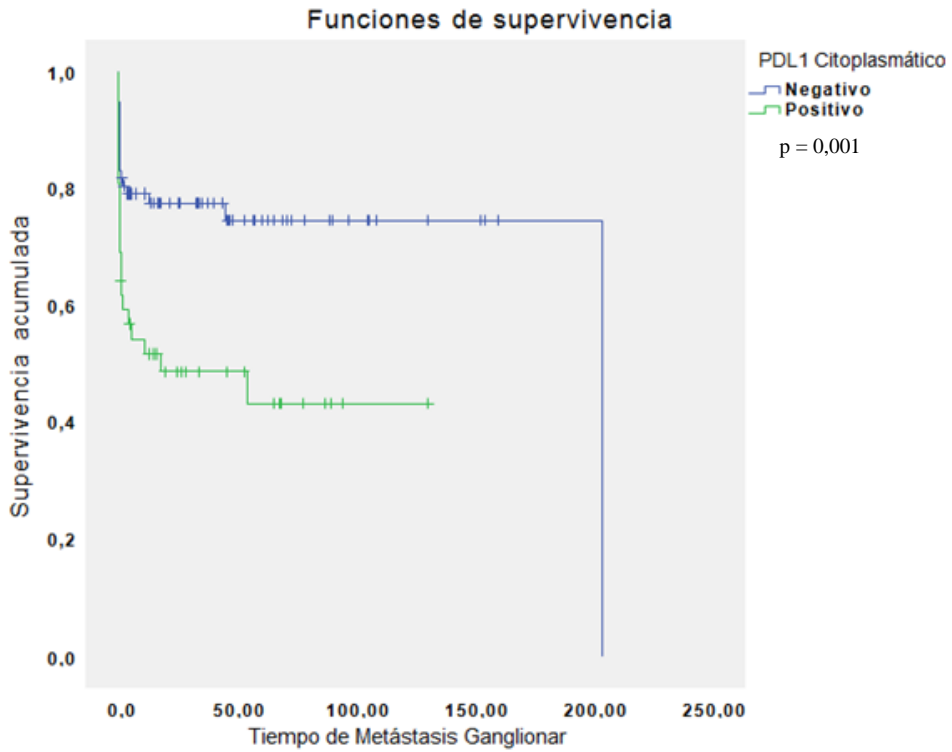
IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

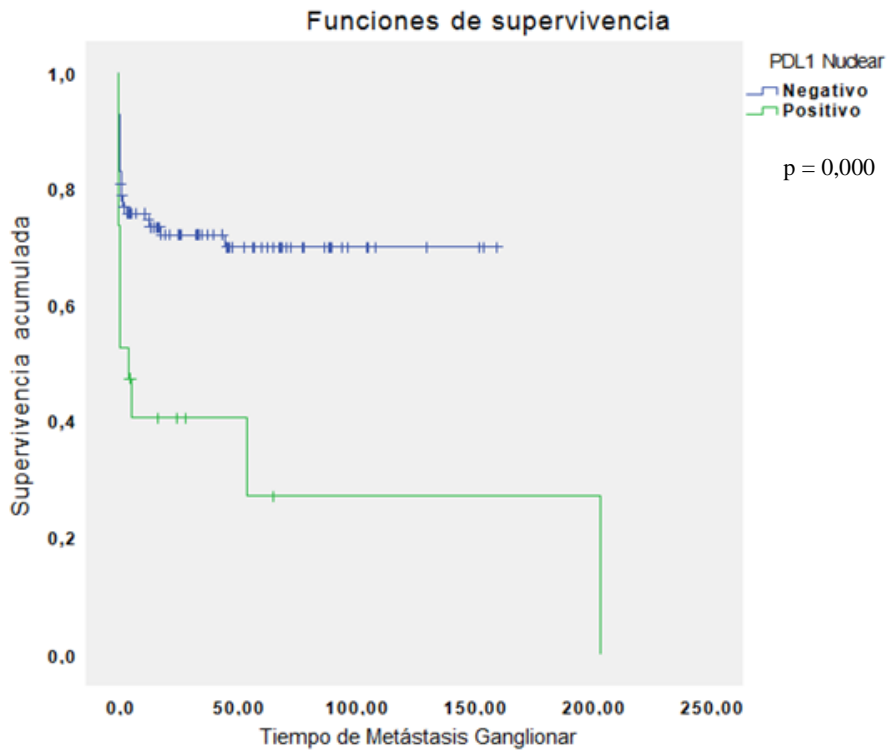
OR: Odds ratio

4.3.2.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN PARA PD-L1 CON EL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA Y LOS INTERVALOS LIBRES DE ENFERMEDAD LOCAL, REGIONAL Y A DISTANCIA.

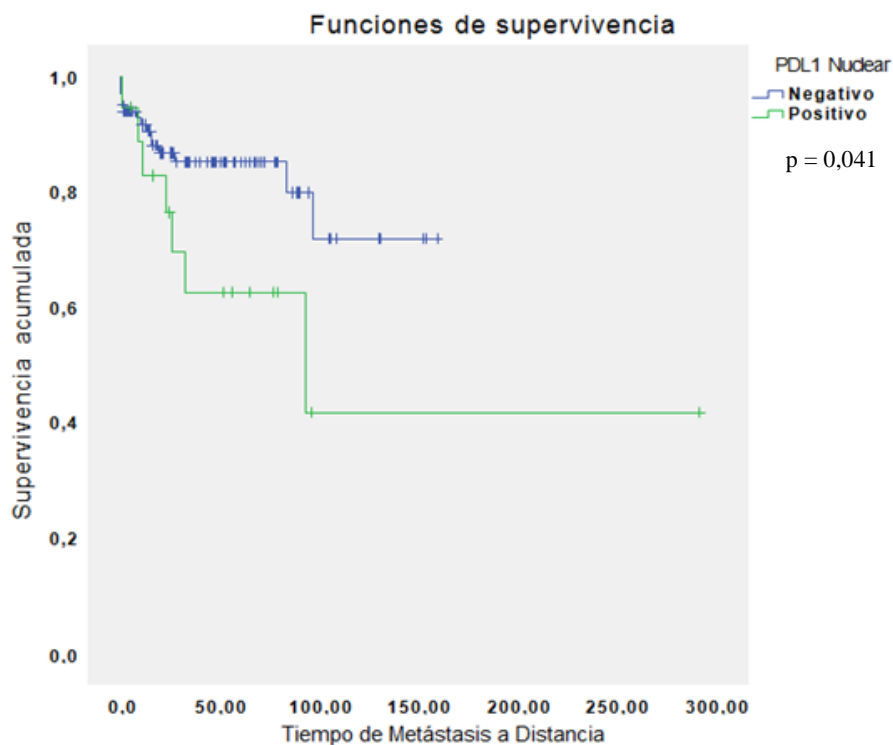
Las curvas de Kaplan-Meier nos revelan resultados destacables para las variables PD-L1 (citoplasmática/membranosa y nuclear). Observamos una asociación positiva entre la expresión inmunohistoquímica citoplasmática/membranosa para PD-L1 y un acortamiento del intervalo libre de metástasis ganglionares.



Observamos una asociación positiva entre la expresión inmunohistoquímica nuclear para PD-L1 y un acortamiento del intervalo libre de metástasis ganglionares.



Observamos una asociación positiva entre la expresión inmunohistoquímica nuclear para PD-L1 y un acortamiento del intervalo libre de metástasis a distancia.



4.3.3. PD-1

4.3.3.1. CORRELACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN PARA PD-1 CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA

Tras valorar la presencia o ausencia, intensidad y porcentaje de células con inmunotinción citoplasmática/membranosa para PD-1 y estudiar mediante regresión logística su correlación con los diferentes parámetros de evolución clínica se obtuvieron los siguientes resultados:

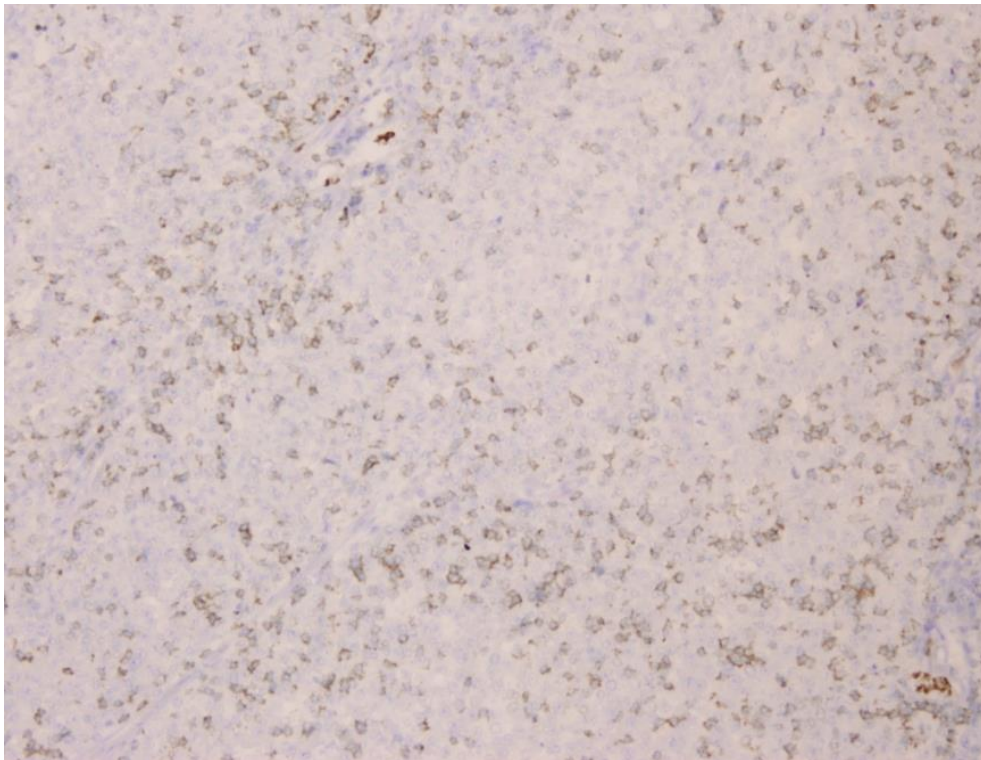


Figura 70. Imagen histológica de inmunotinción para PD-1. 10x.

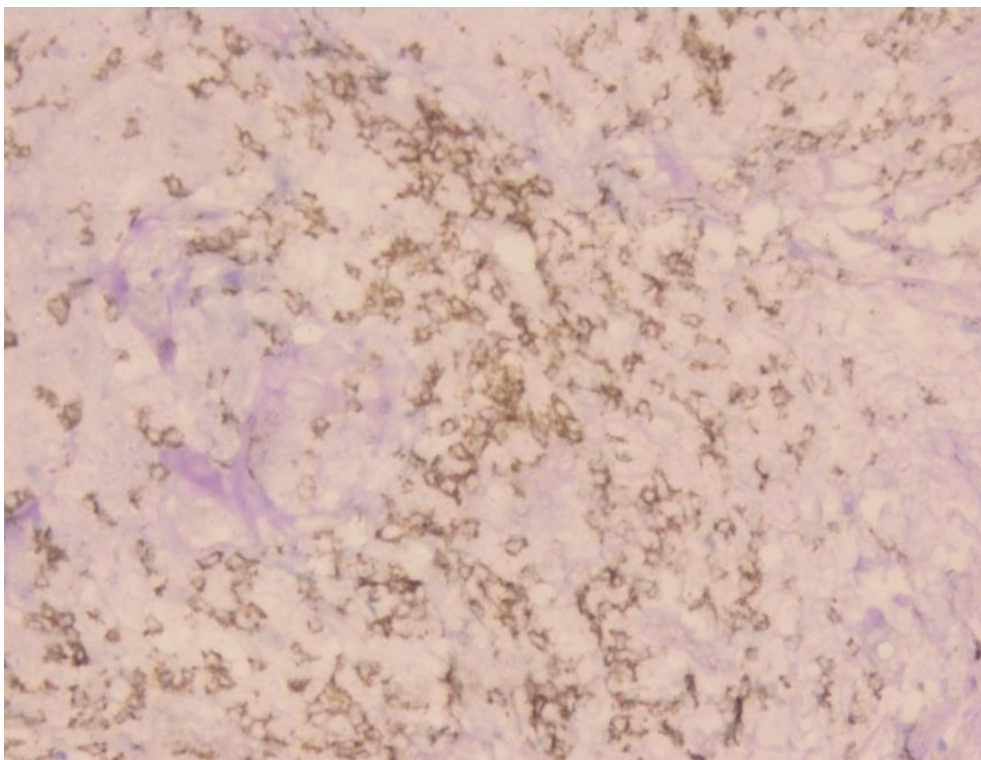


Figura 71. Imagen histológica de inmunotinción para PD-1. 20x.

-No se observó asociación entre la expresión de PD-1 con la aparición de recaída tumoral (Tabla 20)

Tabla 20. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con recaída tumoral

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-1	119	0,441	1,580	0,493	5,06

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-No se observó asociación entre la expresión de PD-1 con el desarrollo de metástasis en tránsito (Tabla 21)

Tabla 21. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con metástasis en tránsito

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-1	119	0,486	1,388	0,552	3,488

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-Se observó una asociación positiva entre la expresión de PD-1 con el desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento clínico ($p=0,028$) (Tabla 22)

Tabla 22. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con metástasis ganglionar

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-1	119	0,028	2,24	1,954	5,258

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-No se observó asociación entre la expresión de PD-1 con el desarrollo de metástasis a distancia (Tabla 23)

Tabla 23. Correlación de la inmunotinción de PD-1 con metástasis a distancia

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-1	119	0,101	2,333	0,848	6,421

n: Número de casos

IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

-No se observó asociación entre la expresión de PD-1 con la variable éxito (Tabla 24)

Tabla 24. Correlación de la inmunotinción PD-1 y éxito

Variable	n	p	OR	IC95%	
				Inferior	Superior
PD-1	119	0,589	1,339	0,463	3,87

n: Número de casos

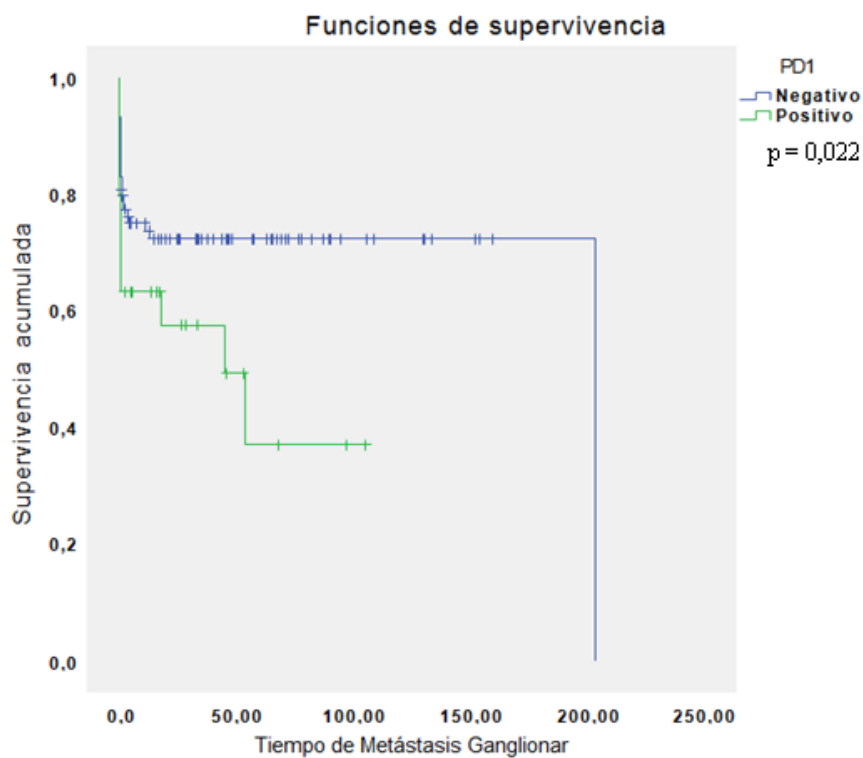
IC: Intervalo de confianza

p: Significación estadística

OR: Odds ratio

4.3.3.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN PARA PD-1 CON EL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA Y LOS INTERVALOS LIBRES DE ENFERMEDAD LOCAL, REGIONAL Y A DISTANCIA.

Observamos una asociación positiva entre la expresión inmunohistoquímica para PD-1 y un acortamiento del intervalo libre de metástasis ganglionares.



4.3.4. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN PARA PD-L1 Y PD-1 CON EL ESTADO MUTACIONAL DE N-RAS

-En la tabla 25 se observa que no hay asociación estadística entre la expresión de PD-L1 y PD-1 y la presencia de mutación N-RAS.

Tabla 25. Correlación de la mutación N-RAS con la inmunotinción para PD-L1 y PD-1

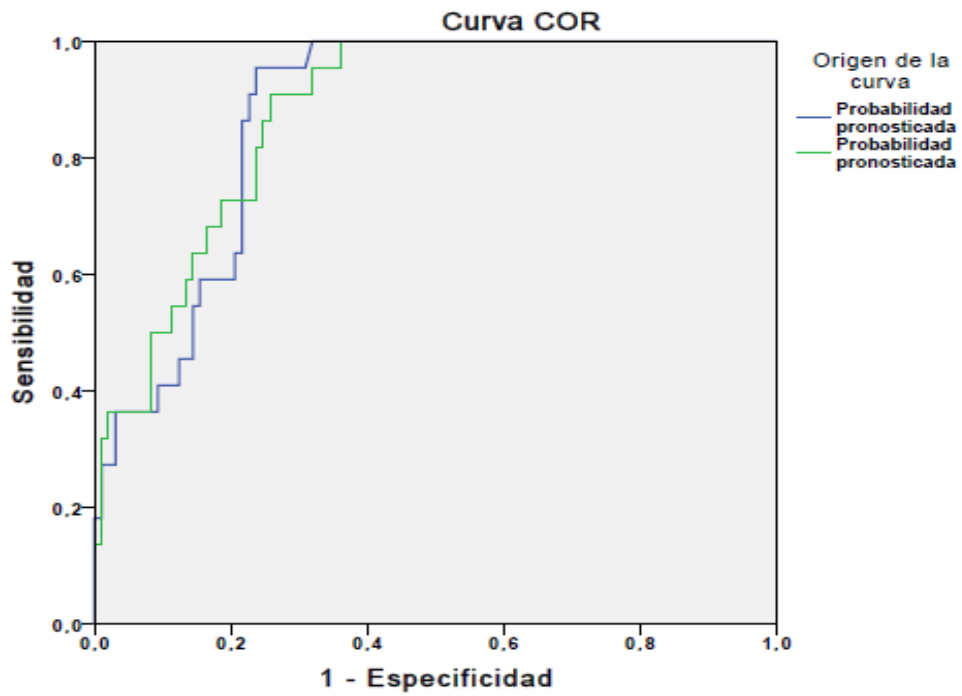
Variable	P	Prueba
PD-L1 Citoplasma Intensidad	0,225	
PD-L1 Citoplasma Porcentaje	0,401	
PD-L1 Núcleo Intensidad	0,211	U de Mann - Whitney
PD-L1 Núcleo Porcentaje	0,249	
PD1	0,908	

4.3.5. -ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO MEDIANTE REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA EL DESARROLLO DE METÁSTASIS A DISTANCIA:

La determinación del mejor modelo predictivo mediante regresión logística paso a paso identifica el índice de Breslow ($p=0,046$) y la inmunotinción citoplasmática/membranosa para PD-L1 ($p=0,035$) como únicos factores independientes del resto y con una asociación positiva con el desarrollo de metástasis a distancia.

4.3.6. ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO MEDIANTE EL ÁREA BAJO LA CURVA ROC PARA EL DESARROLLO DE METÁSTASIS A DISTANCIA:

En el modelo básico de predicción, incluyendo como parámetros clásicos índice de Breslow, ulceración y mitosis/mm², el área bajo curva es de 0,872 y se incrementa ligeramente (0,877) al añadir al modelo la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 citoplasmática/membranosa. Es decir, que 5 de cada 1000 pacientes para los que el modelo clásico no puede predecir el desarrollo de metástasis a distancia pueden beneficiarse del estudio inmunohistoquímico para PD-L1.



5. DESARROLLO ARGUMENTAL

5. DESARROLLO ARGUMENTAL

El melanoma cutáneo es una neoplasia agresiva con unas bases genéticas complejas, y en estadios avanzados es generalmente resistente al tratamiento médico.¹⁵³ En la actualidad hay diversos trabajos que han evaluado el estado mutacional N-RAS en melanoma y su valor como factor pronóstico, encontrando resultados contradictorios.^{153, 156, 157,161}

En nuestra serie, observamos que la mutación N-RAS en el codón 61 estaba mutado en el 18% de los casos y el codón 12, en el 3%. Estos hallazgos van en concordancia con los diferentes estudios realizados acerca de la mutación N-RAS que muestran expresión de la mutación en el codón 61 con una frecuencia que varía entre el 15 y el 25% de los casos mutados, y del codón 12 entre el 1 y el 5% de los casos mutados.^{154,155}

De los casos que tenían mutado el codón 61 de N-RAS, la mutación p.Q61R fue la más prevalente, seguida por la p.Q61K y la p.Q61L. Nuestros resultados son equiparables a diversos estudios que encontraron una distribución de la presencia y tipos de mutaciones.¹⁵⁶ Sin embargo, en un estudio de Grimm y cols. se encontró que la mutación más frecuente era la p.Q61K, seguida de la p.Q61R.¹⁵⁷

No se encontró una asociación de la presencia o ausencia de mutación N-RAS con ninguna de las variables clínico-patológicas, pero sí se observó que la mutación de N-RAS distinta de la Q61 era más frecuente en casos melanomas con regresión tumoral.

En cuanto al tipo histológico de los casos mutados de nuestra serie, se observa que el melanoma nodular es el más frecuentemente mutado, mientras que el melanoma de extensión superficial es el más frecuente en los no mutados. Y respecto a la localización, el tronco es el sitio anatómico de mayor prevalencia de la mutación al igual que en los casos no mutados. En diversos estudios se ha encontrado que el tipo histológico nodular y la localización en extremidades eran las que con más frecuencia presentaban la mutación N-RAS.^{156, 158, 159,160}

En nuestro estudio la mediana de edad de los casos que presentaban la mutación N-RAS es de 62 años, que es algo mayor de la que refieren algunos estudios previos en los que la mediana de edad es de 56 años.¹⁵⁶

En nuestra serie no se observó asociación entre la presencia de mutación N-RAS y los intervalos libres de enfermedad ni la supervivencia global ($p > 0,05$), como tampoco con las variables clinicopatológicas pronósticas clásicas. Al igual que en nuestro estudio, Akslen y su grupo no encontraron asociación entre la mutación N-RAS y las variables clínico-histológicas pronósticas.¹⁶⁰ De hecho, existe controversia sobre el valor pronóstico de la mutación N-RAS entre los diferentes estudios. McArthur y cols. encuentran una asociación de la presencia de mutación N-RAS con una menor supervivencia y tumores más gruesos y con mayor índice mitótico.¹⁷⁷ En el mismo sentido, Jakob y cols. encontraron un acortamiento del tiempo de supervivencia de los pacientes que presentaban mutación N-RAS así como una mayor incidencia de metástasis cerebrales que en los casos no mutados.¹⁵⁶

En cuanto a los resultados inmunohistoquímicos para NRAS Q61R, de los 126 casos analizados por secuenciación, 27 de ellos presentaron mutación N-RAS, y de éstos, 14 presentaron la mutación Q61R y en el estudio inmunohistoquímico mediante un anticuerpo comercial específico para NRAS Q61R, se observó inmunotinción positiva en 13 de los 14 casos que presentaban la mutación Q61R por secuenciación, y ausencia de inmunotinción tanto en el caso restante de los 14 con la mutación p.Q61R, como en todos los casos con mutaciones no-Q61R (Q61K, Q61L y G12D) y aquellos con N-RAS nativo, lo que da una sensibilidad de la inmunohistoquímica con este anticuerpo del 100% y una especificidad del 93%.

En este aspecto, nuestros resultados son comparables con los diferentes estudios que han empleado esta técnica inmunohistoquímica para la detección de la mutación Q61R de N-RAS. Así, Uguen y cols. encontraron en su serie una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99% del anticuerpo NRAS Q61R.^{162,164} En la publicación de Massi y su grupo encuentran con este mismo anticuerpo una sensibilidad y especificidad del 100%¹⁶³. Así mismo, el grupo de Ilie encontró una especificidad del 92% en su estudio.¹⁶⁵

Con todos estos datos podemos decir que el análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo (clon SP174) para detectar la mutación NRAS Q61R tiene una alta sensibilidad y especificidad y debería ser una parte integral en el estudio de los melanomas cutáneos.

PD-L1 y PD-1:

El PD-L1 se expresa en varios tipos de tumores, y la interacción con PD-1 ha demostrado la inhibición de las células T. El bloqueo de PD-L1/PD1 también se ha asociado con mejoría del crecimiento tumoral.^{166,167} Debido a su papel en el desarrollo del tumor, el valor pronóstico de PD-L1 se ha estudiado en varios casos y se ha encontrado que se asocia con mal pronóstico en carcinoma de pulmón de célula no pequeña, carcinoma gástrico y carcinoma de células renales.^{168, 169, 170}

En el estudio realizado por Blank y cols. no se encontró una correlación significativa con el pronóstico de la expresión positiva del anticuerpo PD-L1 en melanoma.¹⁷⁵

En el estudio de la expresión de la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 encontramos en nuestra serie una inmunotinción citoplasmática/membranosa en la mayoría de los casos, y, en un número menor de casos observamos una tinción nuclear moderada/intensa. En la literatura, los reportes de estudios realizados con este anticuerpo no encuentran una tinción nuclear para PD-L1,^{174, 175, 176, 177, 178,179} De hecho, Scolyer y cols. describen que la expresión inmunohistoquímica para PD-L1 es membranosa/citoplasmática y hacen énfasis en que no se observa una tinción nuclear.¹⁸⁰

En nuestro estudio destaca la correlación directa de la inmunotinción positiva citoplasmática/membranosa para PD-L1 con el desarrollo de metástasis en tránsito ($p=0,044$). Así mismo, encontramos una clara asociación positiva entre la expresión inmunohistoquímica citoplasmática/membranosa y nuclear con el desarrollo de metástasis ganglionares. No se observó asociación entre la expresión citoplasmática/membranosa ni nuclear de PD-L1 con el acortamiento del tiempo de recaída local.

Un hallazgo singular en nuestro estudio es correlación de la positividad nuclear para PD-L1 en las células tumorales con un acortamiento del período libre de metástasis a distancia ($p=0,002$), mientras que la tinción citoplasmática no arrojó los mismos resultados, hallazgo que le confiere valor pronóstico a un inmunomarcaje nuclear. Consideramos que la interpretación más plausible de esta inmunotinción nuclear de PD-L1 es la translocación al núcleo de esta molécula en tumores agresivos, algo que se ha descrito previamente para otras moléculas de la superficie celular, como CXCR4 y EGFR, y que también se asocian con un peor pronóstico en diferentes tipos de cáncer.^{181,182}

En cuanto a la supervivencia global, nuestro estudio no se encontró una correlación entre una inmunotinción positiva para PD-L1 y el tiempo de supervivencia de los pacientes con diagnóstico de melanoma cutáneo, resultados descrito también por Blank¹⁷⁵ quienes no encontraron esta relación. Sin embargo en un estudio efectuado por Massi y cols., estos autores observaron un acortamiento del tiempo de supervivencia global.¹⁷⁶

En nuestro estudio, hemos encontrado una asociación positiva de la expresión para PD-1 y el desarrollo de metástasis ganglionares, así como un acortamiento del período libre de metástasis ganglionares. El incremento de la expresión de PD-1 y su ligando (PD-L1) en los melanomas que han metastatizado demuestra que es un factor de mal pronóstico de melanoma cutáneo. Nuestros resultados son similares a los del grupo de Hino¹⁷⁴ quienes encontraron una correlación de PD-L1 con progresión de la enfermedad.

En cuanto a la correlación de la expresión de PD-L1 con las variables clásicas de pronóstico (Breslow, ulceración y mitosis/mm²), encontramos una asociación entre la expresión del PD-L1 con un índice de Breslow >1 mm, explicando así, el mecanismo de “evasión inmunológica” de las células tumorales que escapan a la lisis por activación de las células T, y en consecuencia, permite el crecimiento tumoral. Estos resultados se encuentran también apoyados por los grupos de Hino y Massi.^{174, 176}

El significado funcional de la expresión de PD-L1 está clásicamente atribuido a la inhibición de la respuesta de las células T mediante la unión al receptor de PD-1.¹⁸³ El rol de PD-L1/PD-1 en el desarrollo de tumores ha sido estudiado en diferentes tumores (carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma gástrico y carcinoma de células renales) y se ha asociado a mal pronóstico.^{170,184} Aunque existan muchas publicaciones sobre la expresión de PD-L1 en melanoma, la relevancia pronóstica en pacientes con melanoma ha sido sugerida recientemente.^{171,172}

Nuestros hallazgos evidencian la relevancia clínica de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1. Cuando el PD-L1 se encuentre expresado en la población tumoral de los melanomas primarios, un seguimiento más cuidadoso podría ser requerido ya que una inmunotinción positiva, tanto membranosas/citoplasmática como nuclear, se asocia a un mal pronóstico.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El estado mutacional del gen N-RAS no se correlaciona con el desarrollo de recidiva local o metástasis, con el intervalo libre de enfermedad, ni con el tiempo de supervivencia global específica, por lo que podemos concluir que no influye en el pronóstico del melanoma cutáneo.
2. Una inmunotinción positiva con el anticuerpo SP174 presenta una alta sensibilidad (100%) y especificidad (93%) para la mutación Q61R, la más frecuente del gen NRAS en el melanoma, por lo que puede considerarse una herramienta coste efectiva de gran utilidad para facilitar la detección de esta mutación y la selección de pacientes para terapias frente a dianas moleculares.
3. La inmunotinción positiva para PD-1 en los linfocitos asociados al tumor se correlaciona con el desarrollo de metástasis ganglionares y con un acortamiento del intervalo libre de éstas, por lo que podría considerarse como un posible marcador de diseminación linfática del melanoma.
4. La inmunotinción citoplasmática/membranosa para PD-L1 en las células tumorales del melanoma, es independiente del estado mutacional del gen N-RAS.
5. La presencia de inmunotinción citoplasmática/membranosa positiva para PD-L1 en las células tumorales se correlaciona con el desarrollo de metástasis y con un acortamiento del intervalo libre de metástasis ganglionar.
6. La inmunotinción nuclear para PD-L1, no previamente descrita, es infrecuente, pero el 80% de pacientes en los que se detecta ésta en el melanoma primario, desarrolla metástasis ganglionares, presentando asimismo un acortamiento del intervalo libre de metástasis ganglionares y a distancia.

7. Podemos concluir que, en base a nuestros resultados, la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en melanomas primarios cutáneos debe ser considerada como un factor de mal pronóstico.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Urteaga O, Pack G. On the Antiquity of Melanoma. *Cancer*. 1966; 19:607–610.
2. Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of Melanoma: From mummies to mutations. *Melanoma Res*. 2012; 22: 114-122.
3. Bodenham DC. A study of 650 observed malignant melanomas in the South-West region. *Ann R Coll Surg Engl*. 1968; 43.
4. Roguin A. Rene Theophile Hyacinthe Laennec: the man behind the stethoscope. *Clin Med Res*. 2006; 4:230–235.
5. Denkler K, Johnson J. A lost piece of melanoma history. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 104: 2149–2153.
6. Davis NC. William Norris, M.D: a pioneer in the study of melanoma. *Med J Aust* 1980; 1: 52-54.
7. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969; 29: 705.
8. Breslow A. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Ann Surg*. 1970; 172: 902–908.
9. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 6199–6206.
10. Bevona C, Sober AJ, Melanoma incidence trends. *Dermatol Clin*, 2002. 20: 589-595, vii.
11. Walsh P, Gibbs P, Gonzalez R. Newer strategies for effective evaluation of primary melanoma and treatment of stage III and IV disease. *J Am Acad Dermatol*, 2000. 42: 480-9.
12. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*, 2002. 146 (Suppl 61): 1-6.
13. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127:2893.
14. SEER: SEER Stat Fact Sheets: Melanoma of the skin. Available at: <http://seer.cancer.gov/ststfacts/html/melan.html#incidenceortality>. Accessed September 1, 2010

15. Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*. 2000; 89: 1269-78.
16. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999; 80:827.
17. Cancer mortality atlas of European Union, 1993-1997. Oxford: Oxford University Press, 2003.
18. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001; 14:280-290.
19. Cabanes Domenech A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, et al. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, Centro Nacional de Epidemiología ISCIII. 2009. Madrid. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-publicacionesisciii/fd-documentos/SituacionCancerenEspana1975_2006_2010.
20. Ríos L, Nagore E, López J.L, et al. Registro nacional de melanoma cutáneo. Características del tumor en el momento del diagnóstico: 15 años de experiencia. *Actas Dermosifiliograf*. 2013; 104:789-799.
21. El cáncer en España. Fundación científica de la Asociación Española contra el cáncer. 2005:5-21.
22. Rigel D.S. Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2010; 29: 204-209.
23. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, et al. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol*. 2010; 49: 362-376.
24. Goggins WB, Tsao H. A population-based analysis of risk factors for a second primary cutaneous melanoma among melanoma survivors. *Cancer*. 2003; 97: 639-643.
25. Elwood JM, Gallagher RP, Worth A.J, et al. Etiological differences between subtypes of cutaneous malignant melanoma: Western Canada Melanoma Study. *J Natl Cancer Inst*. 1987; 78: 37-44.
26. Bataille V, de Vries E. Melanoma-part 1: epidemiology, risk factors, and prevention. *BMJ*. 2008;337: a2249.

27. Chang YM, Barret JH, Bishop DT, et al. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int J Epidemiol.* 2009a; 38: 814-830.
28. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA.* 1997; 277: 1439-1444.
29. Swerdlow AJ, English JS, Qiao Z. The risk of melanoma in patient with congenital nevi: a cohort study. *J Am Acad Dermatol.* 1995; 132: 595-599.
30. Hemminki K, Zhang H, Czene K. Familial and attributable risks in cutaneous melanoma: effects of proband and age. *J Invest Dermatol.* 2003; 120: 217-223.
31. Fusaro RM, Lynch HT. The FAMMM syndrome: epidemiology and surveillance strategies. *Cancer Invest.* 2000; 18:670-680.
32. Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, et al. Risk of melanoma and other cancers in melanoma-prone families. *J Invest Dermatol.* 1993; 100: 350S-355S.
33. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, et al. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol.* 2007; 129: 1666-1674.
34. Zell JA, Cinar P, Mobasher M, et al. Survival for patients with invasive cutaneous melanoma among ethnic groups: the effects of socioeconomic status and treatment. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 66-75.
35. Vagero D, Swerdlow AJ, Beral V. Occupation and malignant melanoma: a study based on cancer registration data in England and Wales and in Sweden. *Br J Int Med.* 1990; 47: 317-324.
36. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-part D: radiation. *Lancet Oncol.* 2009; 10:751-752.
37. Koh, HK, Kligler BE, Lew RA. Sunlight and cutaneous malignant melanoma: evidence for and against causation. *Photochem Photobiol.* 1990; 51:765-779.
38. Holman, CD, Armstrong BK, Heenan PJ. Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits. *J Natl Cancer Inst.* 1986; 76: 403-414.
39. Dong J, Phelps RG, Qiao R, et al. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 3883-3885.

40. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003; 33: 19–20.
41. Uribe P, Wistuba II, González S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol.* 2003; 25: 365–370.
42. Diffey B. Climate change ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. *Phys Med Biol.* 2004; 118: 812-817.
43. Stern RS, The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44:755-761.
44. Siple JF, Wanlass WA, Rosenblatt BK. Levodopa therapy and the risk of malignant melanoma. *Ann Pharmacother.* 2000; 34: 382-385.
45. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82: 364-380.
46. Levi F, Te VC, Randimbison L., et al. Cancer risk in women with previous breast cancer. *Ann Oncol.* 2013;14: 71-73.
47. Acosta AE, Fierro E, Velásquez VE, et al. Melanoma: pathogenesis, clinic and histopathology. *Rev Asoc Col Dermatol.* 2009; 17: 87-108.
48. Miller A, Mihm M. Mechanisms of disease melanoma. *N Engl J Med.* 2006; 355: 51-65.
49. Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol.* 1986; 17: 443-450
50. Merkow LP, Burt RC, Hayeslip DW, et al. A cellular and malignant blue nevus: a light and electron microscopic study. *Cancer.* 1969; 24:888-896.
51. Contey J, Lattes R, Orr W. Desmoplastic malignant melanoma (a rare variant of spindle cell melanoma). *Cancer.* 1971;28: 914-936
52. Schoeckel C, Castra CE, Braun-Falco O. Nevoid malignant melanoma. *Arch Derm Res.* 1985; 277: 362-369.
53. Rutten A, Huschka U, Requena C, et al. Primary cutaneous signet-ring cell melanoma: A clinicopathologic and immunohistochemical study of two cases. *Am J Dermatopathol.* 2003; 25: 418-422.
54. Zalaudek I, Marghoob AA, Scope A, et al. Three roots of melanoma. *Arch Dermatol.* 2008; 144:1375-1379.

55. Stolz W, Schmoeckel C, Welkovich B, Braun-Falco O. Semiquantitative analysis of histologic criteria in thin malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol.* 1989; 20:1115-1120.
56. Sagabiel R. Clinical presentation. En: Miller SJ, Maloney ME, editors. *Cutaneous oncology. Pathology, diagnosis and management.* Malden: Blackwell Science. 1998. 253-261.
57. Weedon D, eds. *Skin Pathology.* London; New York: Churchill Livingstone; 2002.
58. Phan A, Touzet S, Dalle S, et al. Acral lentiginous melanoma: histopathological prognostic features of 121 cases. *Br J Dermatol.* 2007; 157: 311-318.
59. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009; 27:6199-6206.
60. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, et al. 3rd, Daud A, et al. Melanoma, version 2.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN.* 2013; 11:395-407.
61. Wisco OJ, Sober AJ. Prognostic factors for melanoma. *Dermatol Clin.* 2012; 30:469-485.
62. Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, et al. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control.* 2005; 12:223-229.
63. Garbe C, Peris K, Hauschild A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline-Update 2012. *Eur J Cancer.* 2012; 48: 2375-2390.
64. Testori A, Suciú S, van Akkooi AC, et al. EORTC Melanoma Group achievements. *Eur J Cancer Suppl.* 2012; 10:112-119.
65. Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, et al. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer.* 1980; 45:3012-3017.
66. Tejera-Vaquerizo A, Solís-García E, Ríos-Martín JJ, et al. Factores pronósticos en el melanoma cutáneo primario no incluidos en la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Actas Dermosifiliogr.* 2011; 102: 255-263.
67. Clark Jr WH, Elder DE, Guerry 4th, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81: 1893-1904.

68. Clemente CG, Mihm Jr MC, Bufalino R, et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996; 77:1303-1310
69. Tuthill RJ, Unger JM, Liu PY, et al. Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma: a Southeast Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol*. 2002; 118:504-511.
70. Montane KT, Elder DE. Factors predictive of metastasis and outcome. En: Miller SJ, Maloney ME, editors. *Cutaneous oncology. Pathophysiology diagnosis, and management*. Malden: Blackwell Science; 1998. 278-89.
71. Hurt M.A. Types of melanoma?. *J Am Acad Dermatol*. 2008 58:1059-1060.
72. Sánchez-Yus E, Herrera M, Simón RS, L. Requena. Pero. ¿hubo alguna vez una clasificación de Clark de los melanomas?. *Actas Dermosifiliogr*, 2010; 101: 19-30.
73. Thorn M, Ponten F, Bergstrom R, et al. Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86: 761-769
74. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, et al. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*. 2001; 137: 1169-1173.
75. Newlin HE, Morris CG, Amdur RJ, et al. Neurotropic melanoma of the head and neck with clinical perineural invasion. *Am J Clin Oncol*. 2005; 28: 399-402.
76. Quinn MJ, Crotty KA, Thompson JF, et al. Desmoplastic and desmoplastic neurotropic melanoma. *Cancer*. 1998, 83:1128-1135.
77. Chen JY, Hruby G, Scolyer RA, et al. Desmoplastic neurotropic melanoma: a clinicopathologic analysis of 128 cases. *Cancer*. 2008; 113:2770-2778.
78. Day CL, Harris TJ, Gorstein F, et al. Malignant melanoma. Prognostic significance of “microscopic satellites” in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg*. 1981; 194: 108-112.
79. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005; 353: 2135-2147.

80. Kamb A, Gruis N, Weaber-Feldhaus J, Liu Q, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994; 264:436-440.
81. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A., et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994; 368:753-756.
82. Chin L, Garrawaigy LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. 2006; 20: 2149-2182.
83. Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol*. 2009; 27: 46-52.
84. Chudnovsky Y, Khavar PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*. 2005; 115: 813–824.
85. Gruber F, Kastelan M, Brajac I, et al. Molecular and genetic mechanism in melanoma. *Coll Antropol*. 2008; 2: 147-152.
86. Griewankess KG, Scolyer RA, Thompson JF, et al. Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106: 1-17.
87. Iao Z, Chen J, Levine A, et al.. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein mdm-2. *Nature*. 1995; 375: 694-697.
88. Qin X, Chittenden T, Livingston D, Kaelin W. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev*. 1992; 6: 953-964.
89. Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, et al. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by mdm-2 oncoprotein. *Nature*. 1995; 375: 691-704.
90. Soufir N, Avril MF, Chompret A, et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet*. 1998; 7: 209-216.
91. Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, et al. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *Int J Oncol*. 2009; 34:1481-1489.
92. 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.
93. Zuo L, Weger J, Yang Q et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet*. 1996; 12:97-99.

94. Lin TL, Hocker M, Singh H. Genetics of Melanoma Predisposition. *Br J Dermatol.* 2008; 159:286-291.
95. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, et al. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cell in the surrounding skin. *Cancer Res.* 2000; 60: 1968-1973.
96. Avilés JA, Lázaro P. Genetic predisposition in cutaneous melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2006; 97: 229-240.
97. Maresca V, Flori E, Bellei B, Aspite N, et al. MC1R stimulation by alpha-MSH induces catalase and promotes its re-distribution to the cell periphery and dendrites. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 23: 263-275.
98. Box NF, et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet.* 2001; 10: 1701-1708.
99. Hansson J. Familial melanoma. *Surg Clin N Am.* 2008; 88: 897-916.
100. Healy E, et al. Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet.* 2000; 355; 1072-1073.
101. Thomas NE, Kanetsky PA, Begg CB, et al. Melanoma molecular subtypes: unifying and paradoxical results. *J Invest Dermatol.* 2010;130:12-14
102. Omholt K, Platz A, KantR L, et al. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:6483-8.
103. Uehling D.E., Harris P.A. Recent progress of MAP kinase pathway inhibitors. *Bioorg Med Chem. Lett.* 25. 2015; 4047–4056
104. Miller AJ, Mihm MC. Mechanisms of disease Melanoma. *N Engl J Med.* 2006; 355: 51-65.
105. Straume O, Smeds J, Kaumar R, et al. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540C T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma in vertical growth phase. *Am J Pathol.* 2002; 161: 2290-237.
106. Whitwam T, Vanbrocklin MW, Russo ME, et al. Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene.* 2007; 26: 4563–4570.
107. Akslen LA, Angelini S, Straume O, et al. BRAF and NRAS mutation are frequent nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol.* 2005; 125: 312-317.

108. Ross AL, Sanchez MI, Grichnik JM. Molecular nevogenesis. *Dermatol Res Pract.* 2011; 2011:463184.
109. Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature.* 1982;297: 479–483.
110. Papp T, et al. Mutational análisis of the N-ras, p53, p16INK4, CDK4 and MC1R genes in human congenital melanocytic naevi. *J Med Genet.* 1999; 36: 610-614.
111. Demunter A, Stas M, Degreef H, et al. Analysis of N and K-ras mutation in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol.* 2001, 177: 1483-1489.
112. Safari M, et al. Análisis of RAS mutation in human melanocytic lesions: activation of the ras gene seems to be associated with the nodular type of human malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1995; 121: 23-30.
113. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol.* 2008; 1:395–405.
114. Akslen LA, Puntervoll H, Bachmann IM, et al. Mutation analysis of the EGFR-NRAS-BRAF pathway in melanomas from black Africans and other subgroups of cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2008; 18:29–35.
115. Si L, Kong Y, Xu X, et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur J Cancer.* 2012; 48:94–100.
116. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol.* 2008;1:395–405.
117. Edlundh-Rose E, Egyházi 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: 471–478.
118. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2011; 164: 776–784.

119. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:229–235.
120. Dutton-Regester K, Kakavand H, Aoude LG, et al. Melanomas of unknown primary have a mutation profile consistent with cutaneous sun-exposed melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013; 26:852–60.
121. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, et al. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol.* 1994; 102: 285–90.
122. Griewank KG, Westekemper H, Murali R, et al. Conjunctival melanomas harbor BRAF and NRAS mutations and copy number changes similar to cutaneous and mucosal melanomas. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 3143–5312.
123. Devitt B, Liu W, Salemi R, et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24:666–72.
124. Van Elsas A, Zerp SF, Van der Flier S, et al. Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am J Pathol.* 1996; 149:883–93.
125. Demunter A, Stas M, Degreef H, De Wolf-Peeters C. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor. *J Invest Dermatol.* 2001; 117: 1483-1489.
126. Landi MT, Bauer J, Pfeiff RM, et al. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science.* 2007; 31: 521-522.
127. Yu H, McDaid R, Lee J, Possik P, et al. The role of BRAF mutation and inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *Am J Pathol.* 2009; 174: 2367-2377.
128. Gill M, Tok Celebi J. B-RAF and melanocytic neoplasia. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 53: 108-114.
129. Smalley KS, Xiao M, Villanueva, Nguyen TK, et al. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *J Oncogene.* 2009; 28:85-94.
130. Saldanha G, Potter L, Daformo P, Pringle JH. Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4499-4505.

131. Burd CE, Liu W, Huynh M, et al. Mutation-specific RAS oncogenicity explains N-RAS codon 61 selection in melanoma. *Cancer Discov.* 2014; 4: 1418-1429.
132. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:336
133. Liang SC, Latchman YE, Buhmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol.* 2003; 33:2706-2716.
134. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1975; 53:27-42.
135. Okazaki T, Honjo T. The PD- 1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* 2006; 27:195-201
136. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992; 11:3887-3895.
137. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics.* 1994; 23:704-706.
138. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192:1027-1034.
139. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002; 84:57-62.
140. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:5336-5341.
141. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol.* 2003; 170:1257-1266.
142. Carter L, Fouser LA, Jussif J, et al. PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002; 32:634-643.
143. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol.* 2006; 90:51-81.

144. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002; 3:999-1005.
145. Dong H, Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. *J Mol Med.* 2003; 81: 281-287.
146. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L. B7- H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood.* 2008; 111:3635-3643.
147. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2008; 111:3220-3224.
148. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 17174-17179
149. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005;65:1089-1096
150. Geng H, Zhang GM, Xiao H, et al. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encodings PD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 2006;118:2657-2664
151. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PDL1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood.* 2007; 110:296-304.
152. Dong H, Strome SE, Matteson E, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2003; 111:363-70.
153. Vikas K Goel, Alexander J.F. Lazar, Carla L, et al. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 154-160.
154. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene.* 1989; 4:1363-1374.

155. Mandalà M, Merelli B, Massi D. Nras in melanoma: Targeting the undruggable target. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2014; 92: 107-122.
156. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 2012; 15; 118:4014-4023.
157. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:229-235.
158. Edlundh-Rose E, Egyházi 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; 16:471-478.
159. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutation are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011; 164:776-784.
160. Akslen LA, Angelini S, Straume O, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol*. 2005; 125:312-317.
161. Ekedahl H, Cirenajwis H, Harbst K, et al. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br J Dermatol*. 2013; 169:1049-1055.
162. Uguen A, Guéguen P, Legoupil D, et al. Dual NRASQ61R and BRAFV600E mutation-specific immunohistochemistry completes molecular screening in melanoma samples in a routine practice. *Human Pathology*. 2015. Article in press.
163. Massi D, Simi L, Sensi E, et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of NRASQ61R mutation in melanoma. *Mod Pathol*. 2015; 28: 487-497.
164. Uguen A, Talagas M, Costa S, et al. NRAS Q61R, BRAF V600E immunohistochemistry: a concomitant tool for mutation screening in melanomas. *Diagn Pathol*. 2015; 10:121.

165. Ilie M, Long-Mira E, Funck-Brentano E, et al. Immunohistochemistry as a potential tool for routine detection of the NRAS Q61R mutation in patients with metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015; 72:786-793.
166. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunoter*. 2005; 54: 307-314.
167. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 677-704.
168. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:5094-5100.
169. Wu C, Zhu Y, Jiang J, et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*. 2006; 108:19-24.
170. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006; 66:3381-3385.
171. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002; 8:793-800.
172. Blank C, Kuball J, Voelkl S, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer*. 2006; 119:317-327.
173. Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, et al. Tumor progression despite massive influx of activated CD8 (+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55:1185-1197.
174. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1. Is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010; 116: 1757-1766.

175. Gadiot J, Hooijkaas AI, Andrew D, et al. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer*. 2011; 117: 2192-2201.
176. Massi D, Brusa D, Marelli B, et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Annals of oncology*. 2014; 25: 2433-2442.
177. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in melanoma brain metastases. *Histopathology*. 2015; 66: 289-299.
178. Tharini A.A, Zahoor H, Yearley L, et al. Tumor associated PD-L1 expression pattern in microscopically tumor positive sentinel lymph nodes in patients with melanoma. *J Transl Med*. 2015; 13: 319
179. Massi D, Brusa D, Merelli B, et al. The status of PD-L1 and tumor-infiltrating immune cells predict resistance and poor prognosis in BRAF i-treated melanoma patients harboring mutant BRAF^{V600}. *Ann Oncol*. 2015; 9: 1980-1987.
180. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti PD-1/PDL-1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015; 28: 245-253.
181. Hadzisejdic I, Mustac E, Jonjic N, et al. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis. *Mod Pathol*. 2010; 23: 392-403.
182. Speetjens FM, Liefers GJ, Korbee CJ, et al. Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. *Cancer Microenviron*. 2009; 2: 1-7.
183. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoint in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 252-264.
184. Konisshi J, Yamazaki K, Azuma M, et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 5094-5100.