

# RECOMENDACIONES DEL CLUB DE DERMATOPATOLOGÍA DE LA SEAP

## Introducción

**Angel Santos-Briz Terrón, coordinador del club**

*Correspondencia: [santosbriz@usal.es](mailto:santosbriz@usal.es)*

En el Grupo Español de Dermatopatología hemos comenzado a diseñar las guías de práctica clínica del Libro Blanco de la SEAP con un tema de gran importancia sociosanitaria: el melanoma cutáneo. Lo hemos hecho por tres razones: el aumento de su incidencia, producido por los cambios del estilo de vida de nuestra sociedad, su mal pronóstico en estadios avanzados y, fundamentalmente, por el desarrollo en los últimos años de nuevas terapias para pacientes con enfermedad diseminada. Para ello nos hemos centrado en dos temas. En el primero, "El informe de melanoma cutáneo", se exponen los datos obligatorios y recomendables que debe incluir un informe protocolizado de melanoma siguiendo las directrices de los principales protocolos publicados. En el segundo, "Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en melanoma metastásico" se indica qué marcadores moleculares conviene estudiar en pacientes con melanoma, en qué situaciones y la metodología a emplear.



# Informe del Melanoma Cutáneo

**Juan José Ríos Martín**

*Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.*

El informe anatomopatológico protocolizado de un melanoma cutáneo, incluyendo todos los datos histológicos necesarios para predecir su pronóstico, es esencial para el manejo multidisciplinar del paciente. Además, se aconseja que incluya una breve descripción de los hallazgos microscópicos que permiten hacer el diagnóstico de melanoma. En los últimos años se han publicado numerosas guías y protocolos de informes que recogen los principales ítems que no deben de faltar en el informe de un melanoma.

En el presente documento haremos una relación de los datos obligatorios que en nuestra opinión debe de incluir un informe protocolizado de un melanoma cutáneo y los datos recomendados (no obligatorios), lo que no excluye que se pueda añadir texto libre con opiniones personales del autor del informe. Para ello seguiremos las directrices de los principales protocolos publicados (1,2). También haremos una breve recomendación sobre los datos del informe del ganglio centinela.

## **A. DATOS OBLIGATORIOS**

### **1. LOCALIZACIÓN Y LATERALIDAD DEL TUMOR**

Identificar la localización anatómica del melanoma es importante por varias razones: influye en el pronóstico, modifica los hallazgos microscópicos que pueden influir en el diagnóstico correcto y es necesaria en caso de la aparición de metástasis.

### **2. TIPO DE MUESTRA**

El tipo de biopsia realizada puede afectar al estudio patológico, e identificarlo en el informe, es importante para conocer el tipo de muestra que se ha utilizado para el diagnóstico. Obviamente, la biopsia escisional con márgenes libres es el método más apropiado. La biopsia incisional puede no ser representativa de la neoplasia y ocasionar errores diagnósticos.

### **3. ESPESOR DE BRESLOW (en mm)**

Es el factor pronóstico más importante en un melanoma cutáneo primario localizado (3). Debe de medirse desde la capa granulosa de la epidermis hasta la célula más profunda que se encuentre en la dermis en la base del tumor. En los melanomas ulcerados la medición debe de comenzar en el fondo de la úlcera, aunque este hecho pueda infravalorar el espesor de la neoplasia al desconocer la cantidad de melanoma perdido por la úlcera. En el caso de melanomas finos (< de 1mm) algunos autores aconsejan utilizar técnicas inmunohistoquímicas (Melan-A) para identificar con mayor seguridad el componente más profundo y medir con mayor precisión el espesor (4).

Algunas consideraciones importantes sobre la medición son:

- Debe de evaluarse en secciones histológicas perpendiculares a la superficie epidérmica, evitando las secciones tangenciales. Si no fuera posible es recomendable incluir una nota aclaratoria en el informe.
- Si existe regresión histológica, ésta no debe de incluirse en la medición. Si se incluyera esta medición, debe de aclararse en una nota del informe que no corresponde al Breslow real de la neoplasia.
- No debe de incluirse en la medición la extensión perianexial (en dermis adventicia perianexial o invasión extra-adventicia), excepto cuando solo exista invasión en la dermis adventicia y el resto del melanoma sea por tanto intraepidérmico. En estos casos debe de medirse desde la parte interna de la vaina epitelial externa del folículo, o desde la superficie luminal de la glándula sudorípara, hasta la mayor infiltración de la dermis perianexial.
- En biopsias superficiales (no escisionales) se recomienda informar: "Breslow al menos de ..."
- En los casos de existir un nevus melanocítico intradérmico asociado al melanoma se ha de estar seguro de medir el componente invasivo maligno.
- Existen controversias en la medición cuando se observa neurotropismo en profundidad. Se recomienda hacer dos mediciones, incluyendo y sin incluir el neurotropismo.
- Los satélites microscópicos (ver más adelante) no deben de incluirse en la medición.

#### 4. ULCERACIÓN

Es uno de los tres factores pronósticos incluidos por la AJCC en el sistema de Estadificación (3). La auténtica ulceración debe de no ser confundida con una pérdida artefactual de la epidermis; por ello, es necesario observar depósito de fibrina o tejido de granulación para confirmar la existencia de ulceración. Algunos autores recomiendan valorar la extensión de la ulceración en mm ó como porcentaje de la superficie de la neoplasia ulcerada (5).

#### 5. ÍNDICE DE MITOSIS

Numerosos estudios indican que el número de mitosis es un importante factor pronóstico, sin embargo en el sistema de estadificación de la AJCC solo es incluido en los casos T1, subclasificando en T1b cuando existe solo una mitosis en el componente dérmico de un melanoma. El conteo de mitosis se recomienda sea hecho comenzando por el campo con mayor número de mitosis ("hot spot") y siguiendo en campos consecutivos hasta completar 1 mm<sup>2</sup> (aproximadamente 5 campos de gran aumento). Puede facilitarse el recuento con técnicas inmunohistoquímicas, con o sin técnicas digitales auxiliares, pero hasta la fecha no han demostrado mayor fiabilidad que el sistema clásico de valoración con HE.

#### 6. MÁRGENES QUIRÚRGICOS

El informe debe de incluir si los márgenes, lateral y profundo, están o no afectados por la neoplasia. En los casos en los que éstos estén libres se recomienda incluir la distancia en mm desde el componente in situ al margen lateral y desde el componente invasivo a los márgenes lateral y profundo. Estos datos ayudan al clínico en el manejo posterior del paciente y también a los patólogos en el estudio de piezas de re-escisión para determinar si una recidiva local del melanoma se trata de persistencia del primario o de una metástasis.

#### 7. INVASION LINFOVASCULAR

Aunque es un hallazgo no muy frecuente, es importante por implicar un peor pronóstico. El uso de técnicas inmunohistoquímicas con marcadores de endotelio vascular facilita la búsqueda de esta invasión.

#### 8. NEUROTROPISMO

Puede observarse invasión peri o intraneural. La presencia de estructuras "neuroides" formadas por las células neoplásicas se relaciona también con el neurotropismo. No debe de confundirse con el atrapamiento de nervios en el seno del melanoma. La presencia de neurotropismo se relaciona con recidivas locales.

## 9. MICROSATÉLITE

Se define como un nódulo neoplásico (> 0,05 mm) separado al menos 0,3 mm de la neoplasia principal por dermis normal (sin fibrosis o inflamación) o hipodermis. Los microsátélites y las metástasis "en tránsito" tienen la misma consideración como factores pronósticos en el sistema de estadificación de la AJCC (estadio N3). La existencia de un microsátélite en el margen de extirpación debe de ser un indicador para la re-escisión.

## B. DATOS RECOMENDADOS (NO OBLIGATORIOS)

### 1. SUBTIPO HISTOLÓGICO DE MELANOMA

Los subtipos histológicos de melanoma descritos por Clark: de extensión superficial, nodular, lentiginoso acral y lentigo maligno melanoma, tienen poca relevancia pronóstica y para el manejo clínico. Además, su interpretación es subjetiva y poco reproducible. Es de mayor interés en la actualidad clasificar los melanomas en invasivos y no invasivos, y si es posible en base a las mutaciones genéticas existentes (BRAF, NRAS, KIT ...), que están en estrecha relación con la localización anatómica.

### 2. NIVEL DE CLARK

Los niveles de invasión descritos por Clark han sido desplazados por el espesor de Breslow, aunque pueden aportar información pronóstica en los casos de difícil valoración del espesor.

### 3. INFILTRADO INFLAMATORIO LINFOCITARIO

El interés pronóstico del infiltrado inflamatorio es motivo de debate. La mayoría de los autores sugieren que la existencia de un denso infiltrado se asocia a un mejor pronóstico; el problema es la variabilidad interobservador en la cuantificación. Puede gradarse en ausente, escaso o llamativo; en este último caso se puede añadir si es peri o intratumoral.

### 4. REGRESIÓN TUMORAL

El significado pronóstico de la regresión también es controvertido. Algunos autores han demostrado un peor pronóstico en melanomas finos, probablemente por infravaloración del espesor de Breslow. No existen criterios definidos y reproducibles para su valoración. Puede valorarse como más o menos del 75% de la neoplasia.

Es importante destacar que la existencia de regresión en los márgenes de una pieza quirúrgica es indicación de re-escisión.

### 5. LESIÓN MELANOCÍTICA ASOCIADA

Es relevante solo por las consideraciones patogénicas del melanoma y también para estudios clínicos de otra índole.

## INFORME DEL GANGLIO CENTINELA

En relación al informe anatomopatológico del ganglio centinela no existen protocolos estandarizados, probablemente porque tampoco existe un procedimiento consensuado de tallado, inclusión, números de secciones histológicas y uso de técnicas inmunohistoquímicas. No cabe duda que el método utilizado puede afectar a la tasa de positividad de metástasis (6).

El procedimiento de corte más utilizado es la sección en cortes transversales del ganglio linfático, siguiendo su eje mayor, y su inclusión completa. En nuestra opinión, de cada bloque deben hacerse cortes histológicos al menos a 3 niveles (los dos primeros teñidos con HE y el tercero con Melan-A).

El informe del ganglio centinela debe de incluir:

- Número de ganglios centinelas
- Número de ganglios positivos
- Localización de la metástasis en el ganglio (subcapsular, intraparenquimatosa o ambas)
- El diámetro máximo de la metástasis mayor
- La presencia o ausencia de extensión extranodal.

## **Bibliografía**

1. Scolyer RA, Judge MJ, Evans A, et al. Data set for pathology reporting of cutaneous invasive melanoma. Recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR). *Am J Surg Pathol* 2013; 37:1797-1814.
2. Scolyer RA, Prieto VG. Melanoma pathology: important issues for clinicians involved in the multidisciplinary care of melanoma patients. *Surg Oncol Clin N Am* 2011; 41:470-473.
3. AJCC(American Joint Committee on Cancer). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2009.
4. Drabeni M, Lopez-Vilaró L, Barranco C, et al. Differences in tumor thickness between hematoxylin and eosin and Melan-A immunohistochemically stained primary cutaneous melanomas. *Am J Dermatopathol* 2013; 35:56-63.
5. In 't Hout FE, Haydu LE, Murali R, Bonenkamp JJ, Thompson JF, Scolyer RA. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 2012 Jun; 255(6): 1165-70.
6. Cole ChM, Ferringer T. Histopathologic evaluation of the sentinel Lymph node for malignant melanoma: the unstandardized process. *Am J Dermatopathol* 2014; 36:80-87.

# Recomendaciones para la determinación de Biomarcadores en Melanoma Metastásico.

Angel Santos-Briz (1), Maite Fernandez Figueras (2) , Maria Dolores Lozano (3), Juan José Ríos Martín (4) , José Luis Rodríguez Peralto (5)

(1) Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca

(2) Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona

(3) Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona

(4) Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla

(5) Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

## INTRODUCCIÓN

La agresividad y la resistencia a la quimioterapia convencional del melanoma metastásico son un claro reflejo de los complejos mecanismos de tumorigénesis u oncogénesis implicados en el melanoma. No ha sido hasta los últimos años cuando se han logrado identificar algunas de las aberraciones genéticas más relevantes que subyacen a esta neoplasia.

En el año 2005, el grupo de Bastian et al. demostró la existencia de distintas vías moleculares de malignización en el melanoma, cada una de ellas con una relación diferente con la exposición a la luz ultravioleta y, por tanto, con el tipo de daño solar. También abrió un nuevo paradigma diagnóstico y farmacológico que ha causado uno de los cambios terapéuticos más relevantes de los últimos años<sup>1</sup>. Este estudio dio el soporte conceptual para la identificación de una serie de posibles dianas, y permitió el desarrollo de moléculas con una actividad frente al melanoma absolutamente extraordinaria, dados los escasos avances obtenidos con la quimioterapia convencional en los años precedentes<sup>2</sup>.

Simultáneamente, tras la definición de mecanismos y moléculas clave en la regulación inmunitaria antitumoral en modelos experimentales, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que han demostrado una actividad antitumoral y unas tasas de control de enfermedad superiores a las obtenidas mediante quimioterapia<sup>3</sup>. Estos avances hacen necesaria la actualización de los protocolos diagnósticos y terapéuticos en el melanoma metastásico<sup>4</sup>.

## IMPORTANCIA CLÍNICA DE LOS BIOMARCADORES EN MELANOMA

### Mutación de *BRAF*

Aproximadamente la mitad de los melanomas presentan una mutación activadora en *BRAF*. En tres cuartas partes de los casos la mutación corresponde a V600E, y con menos frecuencia a V600K y a otras variantes<sup>5</sup>. Esta mutación parece un evento precoz en el desarrollo del tumor y ha permitido el desarrollo de fármacos

que inhiben específicamente esta proteína mutada. Los fármacos inhibidores de BRAF son más eficaces que la quimioterapia convencional en el tratamiento del melanoma diseminado. El primero de los nuevos inhibidores de BRAF es Vemurafenib, que se administra de forma continua por vía oral<sup>6</sup>. Más recientemente se han comunicado los resultados obtenidos con otro inhibidor de BRAF denominado Dabrafenib, que también se administra por vía oral.

Considerando el beneficio clínico y la prolongación de la supervivencia global obtenidos en estos pacientes, los inhibidores de BRAF se han convertido en el tratamiento de elección para el melanoma avanzado con mutación en *BRAF*. A pesar de la elevada actividad de los nuevos inhibidores de BRAF, la mayoría de los pacientes acaban sufriendo una progresión del tumor. Por tal motivo, se están estudiando los mecanismos relacionados con la resistencia a estos fármacos. De esta forma, se ha observado que aunque suele mantenerse la mutación en *BRAF*, aparecen o se seleccionan nuevas mutaciones que llevan a reactivar la vía MAPK<sup>7</sup>. Estos datos apoyan la investigación con combinaciones de fármacos. Los inhibidores de BRAF producen toxicidad cutánea leve o moderada en la mayoría de los pacientes. Esta puede consistir en fotosensibilidad, exantema, foliculitis, prurito y aparición de queratoacantomas o carcinomas epidermoides. Otras toxicidades frecuentes son la astenia, la artralgia y la elevación de las enzimas hepáticas.

### Alteraciones genéticas de *KIT*

Los melanomas que se originan en las mucosas, en las regiones acrales y en la piel crónicamente expuesta al sol, presentan de manera infrecuente mutaciones en *BRAF*. Sin embargo, pueden albergar mutaciones (10%) y/o amplificaciones (25%) del gen *KIT*<sup>8</sup>, un receptor transmembrana con actividad tirosina cinasa<sup>9</sup>. Las mutaciones en *KIT* se detectan con distintas frecuencias en los siguientes exones: exón 9 (2%), exón 11 (60-70%), exón 13 (15-20%) y exones 17 o 18 (10-15%)<sup>10</sup>. Dado el éxito clínico del tratamiento de los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) con inhibidores de la actividad tirosina cinasa de *KIT*, como imatinib y sunitinib, se ha desarrollado una estrategia similar en el melanoma. Sin embargo, el tipo de mutaciones y la frecuencia con la que se detectan en los exones es diferente. Además, el número aumentado de copias de *KIT* que se ha observado en estos melanomas es un evento raro en los GIST, lo que anticipa que la actividad clínica de estos agentes en los pacientes con melanoma con el gen *KIT* mutado pueda ser inferior. Los estudios que han evaluado el papel pronóstico de las mutaciones de *KIT* en melanoma y la actividad clínica de Imatinib en pacientes con melanoma y alteraciones genéticas en *KIT*<sup>11,12</sup> son controvertidos. En general los datos indican que algunos pacientes con melanomas con el gen *KIT* mutado pueden responder a inhibidores de *KIT*, aunque no existen datos concluyentes.

### Alteraciones genéticas de *NRAS*

Entre los genes *RAS*, las mutaciones más frecuentes en el melanoma son en *NRAS* (10-20%), mientras que las mutaciones en *HRAS* y *KRAS* se detectan aproximadamente en el 1 y el 2% de los melanomas, respectivamente<sup>12</sup>. La mayoría de las mutaciones de *NRAS* se detectan en el codón 60 o 61 del exón 2 (80%), y en el codón 12 o 13 del exón 1 (20%). Además, la presencia de mutaciones en *NRAS* y *BRAF* parece ser mutuamente excluyente, observándose juntas en menos del 1% de los pacientes<sup>13</sup>. Recientemente se ha descrito la presencia de mutaciones simultáneamente en *BRAF* y *NRAS* después del tratamiento con inhibidores selectivos de *BRAF*, como Vemurafenib, aunque antes de iniciar el tratamiento solo era detectable la mutación en *BRAF*. La inhibición farmacológica selectiva de *NRAS* ha tenido poco éxito hasta la fecha, debido a la dificultad de diseñar antagonistas de *NRAS* que inhiban su actividad guanosina trifosfatasa (GTPasa).

### Alteraciones genéticas de *GNAQ/GNA11*

Hasta el 83% de los melanomas uveales tienen mutaciones en los genes *GNAQ* o *GNA11*. No parece que la presencia de estas mutaciones se asocie con el pronóstico de la enfermedad<sup>14</sup>, aunque su valor puede venir dado por la posibilidad de desarrollar nuevas terapias dirigidas<sup>15</sup>, como la de los inhibidores de MEK. Sin embargo, en la actualidad, dada la ausencia de implicaciones terapéuticas o pronósticas relacionadas con estos genes, no se considera necesaria su determinación asistencial.



### Alteraciones genéticas de *PTEN*

En el 20-40% de los melanomas se puede determinar, mediante inmunohistoquímica, una pérdida o reducción significativa de la expresión de *PTEN* en muestras tumorales<sup>16</sup>. Tanto las mutaciones somáticas puntuales del gen *PTEN* como las deleciones homocigóticas son raras. Dado que la vía PI3K/AKT/*PTEN* puede modularse farmacológicamente, es previsible que sus integrantes principales se conviertan, en un futuro próximo, en biomarcadores con potencial predictivo.

## DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES EN MELANOMA

### I. FASE PREANALÍTICA

Para obtener un óptimo rendimiento en las técnicas moleculares es esencial que se cumplan los máximos estándares de calidad en todas las etapas y, sin duda, obtener un diagnóstico histopatológico correcto es el primer paso. Para ello:

1. Siempre que exista sospecha clínica o radiológica de metástasis es recomendable la *confirmación diagnóstica mediante la realización de una biopsia o punción citológica*. Este abordaje permite, además, disponer de material representativo de la fracción metastatizante del tumor. Aunque es deseable disponer de la máxima cantidad posible de tumor, también se pueden obtener buenos resultados con muestras muy pequeñas, tales como las preparaciones citológicas fijadas en alcohol y teñidas con Papanicolaou procedentes de improntas tumorales o mediante punción y aspiración<sup>17</sup>.
2. Cuando el estudio se realiza en un centro de referencia, es aconsejable que el *diagnóstico sea ratificado por patólogos o dermatopatólogos expertos*.
3. La mayor parte de las muestras relacionadas con el melanoma proceden de tejido *fijado en formol y conservado en parafina*.
  - La *fijación* debe realizarse inmediatamente después de la obtención de la muestra, usando formaldehído tamponado al 10% durante 24 h, intentando no superar las 48 h. La selección del bloque de parafina más idóneo para el estudio posterior debe realizarse examinando una sección teñida con hematoxilina-eosina que sea representativa del tejido presente en el bloque en el momento del estudio. La sección original en la que se realizó el diagnóstico inicial puede diferir mucho del tejido restante, sobre todo si después de su obtención se han cortado secciones adicionales para realizar técnicas especiales.
  - La integridad de los ácidos nucleicos en el material parafinado se pierde con el tiempo, por lo que se debe elegir la *muestra más reciente*.
  - Los mejores resultados se obtienen cuando el tiempo de fijación ha sido óptimo y cuando la muestra contiene una *gran cantidad de tumor y poca necrosis*<sup>18</sup>.
  - Se deben escoger los bloques que contengan *menos pigmento melánico*, ya que es capaz de inhibir por sí solo las enzimas ácido desoxirribonucleico (ADN)-polimerasas, invalidando los resultados.
4. Una vez seleccionado el bloque, se obtienen secciones de 5 µm que se depositan en tubos o sobre laminillas y se fijan mediante estufa a 37 ± 2 °C toda la noche o a 56 ± 2 °C durante 30 min. Si el tamaño del tejido tumoral es igual o mayor a 1 cm<sup>2</sup>, es suficiente con una única sección, pero si la muestra es de tamaño inferior se deben usar más secciones. Después de la obtención de las secciones el *proceso de extracción de ácidos nucleicos* se debe realizar con prontitud, no retrasándolo más de 48 h. En caso de no poder efectuar la extracción rápidamente, la muestra se debe conservar en nevera a 2-8 °C y preferiblemente apartada de la luz. Para evitar contaminaciones cruzadas, las superficies de trabajo y el micrótopo se pueden limpiar con una disolución descontaminante de nucleasas (10% de lejía y 70% de etanol, por ejemplo). Después, se puede aplicar agua libre de nucleasas y secar con una toalla de papel. Es aconsejable utilizar una cuchilla desechable nueva en el micrótopo para cada caso y manipular los bloques con guantes desechables. Los resultados son más precisos cuanto mayor sea la proporción de tumor en la muestra. Por este motivo, si el tumor viable supone menos del 80% del

tejido en el bloque de parafina, se debe efectuar una *macrodissección* para seleccionar la mayor cantidad posible de tumor viable, desestimando el tejido normal y las zonas con necrosis o con hiperpigmentación melánica. La zona de interés se marca con un rotulador permanente sobre una preparación histológica teñida con hematoxilina-eosina y se compara con la superficie del bloque o la sección sin teñir depositada sobre una laminilla. La macrodissección puede realizarse sobre esta sección, rascando el tumor con el extremo de un bisturí, o bien reblandeciendo el bloque de parafina en la estufa a 65 °C durante una hora, y separando con un bisturí la zona de estudio del resto de la muestra.

## II. FASE ANALÍTICA

### 1. Determinación de mutaciones en BRAF

En la actualidad, los métodos moleculares que se utilizan para determinar las mutaciones de BRAF son los mismos que se emplean para otros estudios de patología molecular. Existen publicados numerosos protocolos para identificar mutaciones de BRAF, tanto en tejido tumoral como en sangre periférica, en ADN y en ácido ribonucleico (ARN). Sin embargo, nos centraremos en los sistemas de identificación de mutaciones que se aplican de forma rutinaria en los laboratorios de anatomía patológica, y que básicamente se pueden clasificar en métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, y métodos basados en PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Entre los métodos de secuenciación se encuentra:

- La *secuenciación directa por el método Sanger*, que consiste en el análisis directo de la secuencia de ADN previamente amplificada por PCR. Este es un método de alta especificidad con el que se pueden detectar todas las mutaciones posibles. Sin embargo, es una técnica con una sensibilidad subóptima (25%), que puede dar lugar a falsos negativos. Requiere equipamientos específicos, por lo general ausentes en los laboratorios de anatomía patológica, y para la interpretación del resultado es necesario personal técnico experimentado.
- Otro método de secuenciación es la *pirosecuenciación*, que se basa en una reacción de PCR en la que, por cada nueva base que se añade a la cadena de ADN, se libera un pirofosfato que se traduce en la emisión de luz ultravioleta. Tiene como ventajas ser una técnica en tiempo real, con una alta sensibilidad analítica, sencilla y coste-efectiva. Puede identificar todas las mutaciones posibles dentro de una región de interés. Entre sus inconvenientes destacan que los reactivos pueden resultar caros y que requiere un pirosecuenciador, que no es habitual en los laboratorios convencionales de anatomía patológica. Uno de los equipos comerciales más empleados es el Therascreen BRAF Pyro® de Qiagen, que cumple la directiva europea de diagnóstico in vitro. Por último, en la actualidad se están desarrollando diferentes plataformas de secuenciación masiva para la práctica asistencial.
- La técnica basada en la *RT-qPCR* es actualmente el método más empleado en los servicios de anatomía patológica para la identificación de biomarcadores moleculares en tumores. En esta técnica se utiliza un termociclador que lleva incorporado un lector de fluorescencia con el que es posible cuantificar el ADN sintetizado en cada momento. Entre las ventajas del método de RT-qPCR destaca la alta sensibilidad, que es mayor que con la secuenciación bidireccional de Sanger. Es un método sencillo y rápido, que permite utilizar plataformas preexistentes en los servicios de anatomía patológica para la determinación de otras mutaciones, como KRAS en carcinoma colorrectal y EGFR en carcinoma de pulmón no microcítico. Su mayor inconveniente es que solo detecta mutaciones conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta que en el momento actual las mutaciones de BRAF más frecuentes son la V600E (40-60%) y la V600K (20%)<sup>19-21</sup>, y que ambas son subsidiarias de tratamientos con inhibidores de BRAF, esta técnica es óptima para identificar este tipo de mutaciones. Existen 2 tipos de sondas para la determinación de mutaciones de BRAF, denominadas TaqMan® y Scorpions®.
  - El prototipo de sonda *TaqMan*® para la determinación de mutaciones *BRAF* utiliza la prueba diagnóstica cobas® 4800 BRAF/V600, que está aprobada por la Agencia de Alimentos y Medicamentos

de Estados Unidos (FDA) y tiene el sello de Conformidad Europea (CE). A pesar de ser una prueba inicialmente diseñada para determinar mutaciones en V600E, también es capaz de detectar el 70% de las mutaciones en V600K22, así como las mutaciones de V600D y V600E2.

- Para la técnica RT-qPCR con sondas *Scorpions*<sup>®</sup>, en la actualidad se utiliza la prueba BRAF gen rotor Q (RGQ) PCR de Qiagen<sup>®</sup>. Se trata de un equipo diseñado para determinar la mutación somática V600E de BRAF, que además detecta las mutaciones V600K, V600E compleja (*GAA*) y V600D. En la actualidad dispone de sello CE para diagnóstico. Para la identificación de las mutaciones es conveniente saber interpretar las curvas de amplificación, para lo que se requiere experiencia.
- Existen más métodos basados en la técnica PCR, entre los que se encuentran las pruebas diagnósticas basadas en la PCR convencional, propias de cada laboratorio y también comerciales, que detectan la presencia de mutaciones puntuales de *BRAF* y el análisis de las curvas de fusión de alta resolución.

## 2. Determinación de otros biomarcadores

Si bien en el melanoma no está clara la importancia clínica de las **mutaciones en KIT**, el 20% de los casos con estas mutaciones son sensibles a Imatinib y a otros inhibidores de KIT, aunque en la actualidad esta indicación no está registrada. Las mutaciones ocurren con más frecuencia en el exón 11 y con menos frecuencia en los exones 9, 13, 17 y 18<sup>10</sup>. En el exón 11, la mayoría de las mutaciones (34%) causan la sustitución de una leucina por una prolina en el codón 576. En cualquier caso, se debe realizar el estudio mutacional de los 5 exones del gen. En los casos en que la cantidad o calidad del ADN sea un factor limitante, se evaluarán de forma preferente los exones 9 y 11. Los 2 métodos más utilizados para la determinación de las mutaciones de *KIT* son la secuenciación directa y la RT-qPCR. En cualquier caso, independientemente de la técnica realizada, es importante seleccionar la muestra con un porcentaje adecuado de células tumorales. En algunos casos es conveniente llevar a cabo una microdissección para limitar la presencia de alelos nativos (*wild-type*) de células no tumorales. Las muestras citológicas son también útiles, y puesto que no están sujetas a la fijación con formol, la calidad del ADN es generalmente superior<sup>17</sup>. Es importante destacar que la detección por inmunohistoquímica de la proteína KIT (CD117) no es fiable para predecir mutaciones, lo que conlleva la necesidad de hacer pruebas moleculares<sup>24</sup>.

## III. FASE POSTANALÍTICA

La Tabla 1 muestra un listado de los datos que debe incluir un informe anatomopatológico en la fase postanalítica.

Tabla 1. Informe anatomopatológico de melanoma en la fase postanalítica

<p><i>Identificación del paciente y médico solicitante</i></p> <p><i>Origen anatómico de la muestra</i></p> <p><i>Método de obtención de la muestra</i><sup>a</sup></p> <p><i>Resultado del estudio inmunohistoquímico</i><sup>b</sup></p> <p><i>Pruebas moleculares</i></p> <p>Tipo de muestra<sup>c</sup></p> <p>Calidad de la muestra<sup>d</sup></p> <p>Identificación de la técnica realizada para la determinación del biomarcador/es</p> <p>Resultado de mutaciones y/u otras alteraciones detectadas</p> <p>Identificación del laboratorio responsable del estudio molecular</p> <p>Comentarios adicionales de interés para el peticionario<sup>e</sup></p> <p>Información sobre acreditación de programas de calidad</p> <p><i>Diagnóstico anatomopatológico final</i></p>
---

<sup>a</sup> Mediante cirugía, biopsia, punción, etc.

<sup>b</sup> Si se hubiera realizado.

<sup>c</sup> Tejido fresco, congelado, parafina, extensiones citológicas, etc.

<sup>d</sup> Porcentaje de tumor, microdissección, etc.

<sup>e</sup> Si se considera necesario.

#### IV. CONTROLES DE CALIDAD EXTERNOS

Los laboratorios que realicen determinaciones de biomarcadores moleculares que sean dianas terapéuticas para el tratamiento de los pacientes con melanoma, deben utilizar tecnologías validadas, tanto en su especificidad y sensibilidad, como en su valor predictivo. Además, es recomendable que dichos laboratorios participen en programas de control de calidad externos, como el implantado por la SEAP, para el estudio mutacional de EGFR en los pacientes con adenocarcinoma de pulmón y de KRAS en los pacientes con adenocarcinoma colorrectal. Este programa evalúa la calidad preanalítica, analítica y postanalítica de cada laboratorio. Para ello, los laboratorios participantes reciben casos mutados y sin mutar seleccionados previamente por el centro coordinador del programa, que deben ser estudiados siguiendo los protocolos habituales de trabajo. Los resultados obtenidos por cada laboratorio son evaluados y discutidos por el comité de expertos de la SEAP. En el caso de existir centros de referencia para la determinación de biomarcadores, estos deben poseer la acreditación y certificación necesarias según los estándares exigidos por la autoridad sanitaria de cada comunidad autónoma.

#### V. ASPECTOS PRÁCTICOS

##### 1. Flujo de trabajo y lugar para la realización de las determinaciones

La determinación de mutaciones en el gen BRAF de pacientes con melanoma metastásico se debe realizar de modo prioritario, ya que su resultado va a condicionar el tratamiento farmacológico. Por tanto, el tiempo de realización de la determinación no debería retrasarse. Para conseguirlo, en estos casos es de vital importancia el trabajo multidisciplinar conjunto a través de comités de tumores específicos integrados por oncólogo médico, patólogo, oncólogo radioterápico, dermatólogo, cirujano, biólogo molecular, técnico de anatomía patológica y el resto del personal implicado. Es básico que en los comités de tumores, donde se va a discutir la actitud a tomar con cada paciente, estén representados los responsables de realizar los análisis moleculares. En cualquier caso, los estudios moleculares se deben realizar con la supervisión de especialistas de anatomía patológica que puedan garantizar la selección de la mejor área tumoral, con menor necrosis o pigmentación y máximo componente celular neoplásico.

##### 2. Tiempos recomendados y aceptables

El tiempo es trascendental para estos pacientes, por tanto, una vez se decida que es imprescindible realizar la determinación molecular, el patólogo debe elegir el tejido histológico óptimo disponible. Para ello, debe tener en cuenta que aunque en principio las mutaciones de BRAF suelen ser bastante constantes, es preferible utilizar siempre que sea posible el material tumoral más reciente. En cuanto al tiempo óptimo recomendable, entre la petición al servicio de anatomía patológica hasta la emisión del informe con el resultado del análisis de la mutación molecular en el gen BRAF, debería ser de 4 a 5 días y no exceder nunca los 7 días.

##### 3. ¿Qué pacientes requieren un estudio de biomarcadores?

Los resultados de los recientes ensayos clínicos con inhibidores de BRAF y MEK han sido tan relevantes desde el punto de vista estadístico y clínico, que la incorporación del estudio de mutaciones en BRAF en el melanoma metastásico debe ser considerado hoy día una práctica rutinaria<sup>25,26</sup>. Así, cuando los servicios de anatomía patológica no tengan la experiencia o la infraestructura necesarias para realizar estos análisis, deben contactar con laboratorios de referencia para realizarlos. En nuestro país, muchos laboratorios están acreditados para el estudio molecular de mutaciones de BRAF, y recientemente se ha puesto en marcha la plataforma BRIGHT ([www.biomarkerpoint.com](http://www.biomarkerpoint.com)) como punto de referencia para realizar estos estudios. Además de los estudios moleculares, recientemente se ha descrito la detección de la mutación BRAF V600E por inmunohistoquímica (VE1); no obstante, son necesarios nuevos estudios confirmatorios para su implantación en la práctica clínica habitual.

El interés del estudio de las mutaciones en *NRAS* en pacientes con melanoma metastásico no portadores de mutaciones de *BRAF* está vinculado al contexto del ensayo clínico. Esto mismo se puede decir del análisis mutacional de *GNAQ/GNA11* en melanomas oculares, cuyo papel en la selección de tratamiento está actualmente siendo evaluado en estudios clínicos prospectivos, sin que todavía haya evidencias que justifiquen su realización rutinaria.

El estudio de mutaciones de *KIT* puede considerarse en pacientes con enfermedad irreseccable y tumores primarios con localización acral o en mucosas, sin que pueda recomendarse su estudio en otros melanomas. La detección por inmunohistoquímica del ligando de la proteína de muerte programada 1 (PD-L1) podría ser de interés, si se confirma la actividad de los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y de anti-PD-L1 en melanoma metastásico<sup>27</sup>.

## CONCLUSIONES

A la hora de planificar el tratamiento de cualquier paciente con melanoma metastásico es recomendable conocer previamente el estado mutacional de *BRAF V600E*, cuyo análisis debe ser realizado en laboratorios acreditados y suficientemente experimentados en no más de 7 días. La determinación de otros biomarcadores como *KIT* o PD-L1 podría ser útil en casos específicos de melanomas avanzados, o si se confirma la actividad de los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y de anti-PD-L1, aunque por el momento no se considera que deba formar parte de la práctica clínica rutinaria.

## Bibliografía

1. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2135-47.
2. Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: Targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:349-61.
3. Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:95-106.
4. Martín-Algarra S, Fernández-Figueras MT, López-Martín JA, Santos-Briz A, Arance A, Lozano MD, Berrocal A, Ríos-Martín JJ, Espinosa E, Rodríguez-Peralto JL. Guidelines for biomarker testing in metastatic melanoma: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* 2014;16:362-73.
5. Edlundh-Rose E, Egyhazi S, Omholt K, Mansson-Brahme E, Platz A, Hansson J, et al. *NRAS* and *BRAF* mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: A study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* 2006;16:471-8.
6. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated *BRAF* in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:809-19.
7. Sosman JA, Pavlick AC, Schuchter LM, Lewis KD, McArthur GA, Cowey CL, et al. Analysis of molecular mechanisms of response and resistance to vemurafenib (vem) in *BRAFV600E* melanoma. *ASCO Meeting Abstracts.* 2012;30:8503.

8. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:4340-6.
9. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene c-kit: A new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987;6:3341-51.
10. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6821-8.
11. Mishra PJ, Ha L, Rieker J, Sviderskaya EV, Bennett DC, Oberst MD, et al. Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: A role for Ral in transformation. *Oncogene.* 2010;29:2449-56.
12. Swick JM, Maize Sr JC. Molecular biology of melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67:1049-54.
13. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126: 154-60.
14. Bauer J, Kilic E, Vaarwater J, Bastian BC, Garbe C, de Klein A. Oncogenic GNAQ mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma. *Br J Cancer.* 2009;101:813-5.
15. Sisley K, Doherty R, Cross NA. What hope for the future? GNAQ and uveal melanoma. *Br J Ophthalmol.* 2011;95:620-3.
16. Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des.* 2010;16:34-44.
17. Lozano MD, Labiano T, Echeveste JI, Montana M, Gomez N, Sanmamed MF, et al. Feasibility and reliability of the assessment of BRAF and c-KIT mutations in cytologic samples from metastatic melanoma. *ASCO Meeting Abstracts.* 2011;29:8575.
18. Halait H, Demartin K, Shah S, Soviero S, Langland R, Cheng S, et al. Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the BRAF gene, used as the companion diagnostic test for the novel BRAF inhibitor vemurafenib in metastatic melanoma. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21:1-8.
19. Kirschner M, Helmke B, Starz H, Benner A, Thome M, Deichmann M. Preponderance of the oncogenic V599E and V599K mutations in the B-raf kinase domain is enhanced in melanoma lymph node metastases. *Melanoma Res.* 2005;15:427-34.
20. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2011;29:1239-46.
21. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Millikan RC, Groben PA, Hao H, et al. Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:991-7.
22. Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, Rueschoff J, Meldrum C, Schilling R, et al. Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:1385-91.

23. Buery RR, Siar CH, Katase N, Gunduz M, Lefeuvre M, Fujii M, et al. NRAS and BRAF mutation frequency in primary oral mucosal melanoma. *Oncol Rep.* 2011;26:783-7.
24. Abu-Abed S, Pennell N, Petrella T, Wright F, Seth A, Hanna W. KIT gene mutations and patterns of protein expression in mucosal and acral melanoma. *J Cutan Med Surg.* 2012;16:135-42.
25. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364:2507-16.
26. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;380:358-65.
27. Hersey P, Gallagher S. A focus on PD-L1 in human melanoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19:514-6.