

TESIS

“Prevalencia del Proto-oncogén BRAF V600E en pacientes mexicanos con diagnóstico de melanoma atendidos en el sistema Tec Salud y su asociación histopatológica”

Dr. Angélica B. Rodríguez Baca (R4 RAP)

Identificación

 **ID: IPVBRAAF**

 **Título**

- “Prevalencia del proto-oncogén BRAF V600E en pacientes mexicanos con diagnóstico de melanoma atendidos en el Sistema Tec Salud y su correlación histopatológica”.

 **Autores**

- Dra. Angélica Beatriz Rodríguez Baca
- Dr. Servando Cardona Huerta
- Dr. Jorge Moreno Cuevas
- Dr. Álvaro Barbosa Quintana
- Dra. Rocío Ortiz López



Co-autores y colaboradores

-  Ing. Edith Velázquez Lam
-  Dra. Sandra Santuario Facio
-  Emmanuel Bugarin Estrada
-  José de Jesús Muñoz Gutiérrez

Departamentos Participantes

- ❁ Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital San José, Sistema Tec Salud.
- ❁ Cátedra de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del CITES, ITESM.
- ❁ Unidad de Biología Molecular, Genómica y secuenciación del CIDCS. UANL.

Credenciales

- ✿ Aceptación íntegra por el comité de ética del Centro de Innovación y Transferencia en Salud de la Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey ante la **Comisión Nacional de Bioética (CONBIOETICA19CEI00820130520)** y con número de autorización de **COFEPRIS 13CE19039139 y 13CI19039138.**

Síntesis

- ❁ Estudio retrospectivo, descriptivo y analítico, que tiene como objetivo establecer la prevalencia del proto-oncogén BRAF^{V600E} en la muestra estudiada y su asociación clínico-patológica.
- ❁ Se identificaron pacientes con diagnóstico de Melanoma en un periodo de 17 años, 1995-2012, en los archivos del Hospital. Se obtuvieron bloques de parafina, se revisaron laminillas y se realizó análisis histopatológico y molecular.
 - Se practicó PCR-tiempo real para búsqueda de mutación puntual BRAF^{V600E}, mutaciones BRAF inespecíficas y BRAF^{WT}.
 - Datos histológicos, clínicos y demográficos, de la información recabada del expediente clínico.

Planteamiento

- ❁ No existe bibliografía en México que estudie la prevalencia de mutaciones en melanomas, específicamente en el gen BRAF y NRAS.
- ❁ Los estudios en el mundo que hablan sobre la asociación clínico-patológica del melanoma y mutaciones en el gen BRAF son pocos, y en México inexistentes.
- ❁ A partir del 2011 se aprobaron medicamentos específicos en contra de mutaciones puntuales en el gen BRAF, específicamente BRAF^{V600E}.

¿Cuál será la prevalencia de la mutación BRAF^{V600E} en pacientes mexicanos?
¿Cuál será la prevalencia de mutaciones en el gen BRAF en pacientes mexicanos?
¿Existirá una asociación entre el BRAF-mutante y los hallazgos clínico-patológicos del melanoma en México?

Justificación

- ❁ En nuestro hospital y consistente con la bibliografía, los melanomas se encuentran entre las tres lesiones malignas más comunes en piel, alcanzando a causar hasta 1311 muertes en México en el 2008 (SINAIS).
- ❁ En el Hospital San José, del Sistema TEC Salud, durante el 01 de Enero de 1995 al 31 de Diciembre de 2012, se analizaron un total de 116 pacientes con diagnóstico de melanoma, tanto primario como metastásico.
- ❁ Actualmente el melanoma no tiene cura.
- ❁ Es de suma importancia el estudio genético del melanoma en México para poder ofrecer terapias específicas que podrían impactar positivamente en la sobrevivencia de los pacientes con este diagnóstico.

Objetivo

“Determinar la prevalencia de la mutación del proto-oncogén BRAF^{V600E} en muestras de melanoma provenientes de una población mexicana atendida en el Sistema Tec Salud y su asociación clínico-patológica”.



Objetivos específicos

- ❖ Revisar las muestras de patología de pacientes con diagnóstico de melanoma bajo los criterios de la CAP (Academia Americana de Patología).
- ❖ Revisar datos clínicos de las muestras en archivo.
- ❖ Determinar la prevalencia de la mutación puntual BRAF^{V600E}, BRAF desconocida y BRAF^{WT} en material en parafina por medio de PCR en tiempo real.
- ❖ Determinar si existe asociación entre los parámetros clínico-patológicos y los melanomas BRAF-mutantes.

Hipótesis

❖ *Dado que la prevalencia de mutación específica $BRAF^{V600E}$ en población anglosajona es del 35%, la muestra estudiada tendrá una prevalencia diferente.*

Diseño del estudio

- ❁ Clasificación del estudio:
 - Replicativo en comparación con el mundo.
 - Original en México.

- ❁ Tipo de investigación:
 - Observacional.

- ❁ Características del estudio:
 - Con relación al método observacional:
 - Transversal.
 - Con relación al tipo de análisis:
 - Descriptivo y analítico.
 - En relación al tiempo:
 - Retrospectivo.

Marco teórico

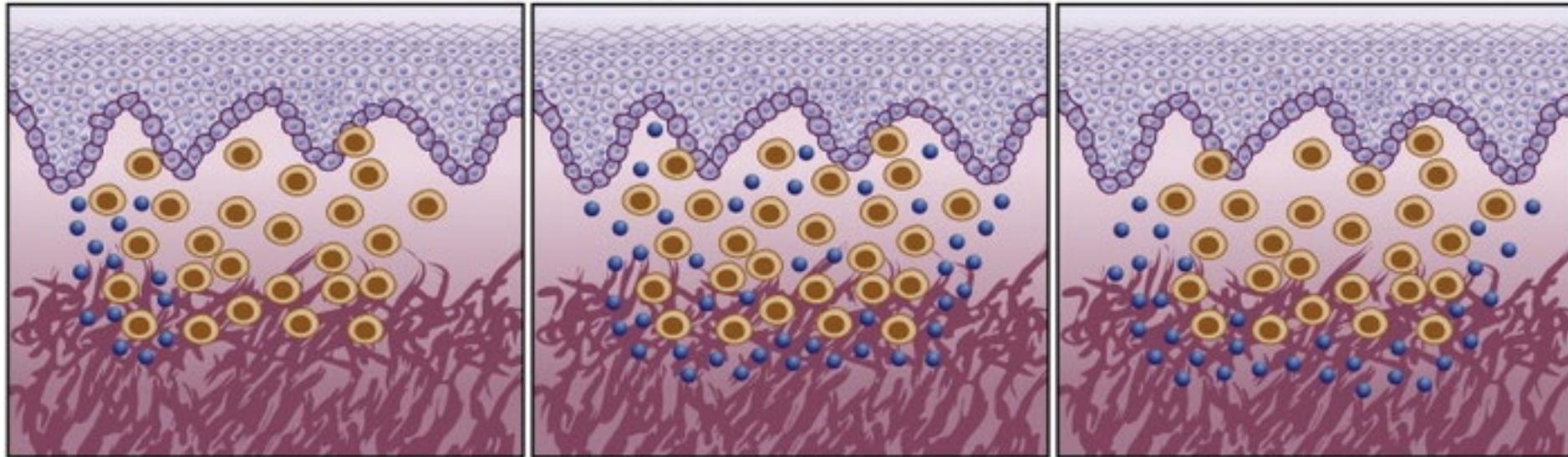
Generalidades

- Es una neoplasia maligna originada en las células névicas que puede ocurrir en todo el cuerpo y tiene una gran capacidad metastásica.
- En fases tardías es incurable, con un promedio de sobrevivida de 6-8 meses.
- La incidencia del melanoma en México es de 1,01/1000 habitantes.
 - Registro histopatológico de neoplasias malignas.
- Ocupa el tercer lugar en cáncer de piel.



Histopatología

- Procedimiento quirúrgico.
- Invasión vascular.



Nonbrisk

Brisk

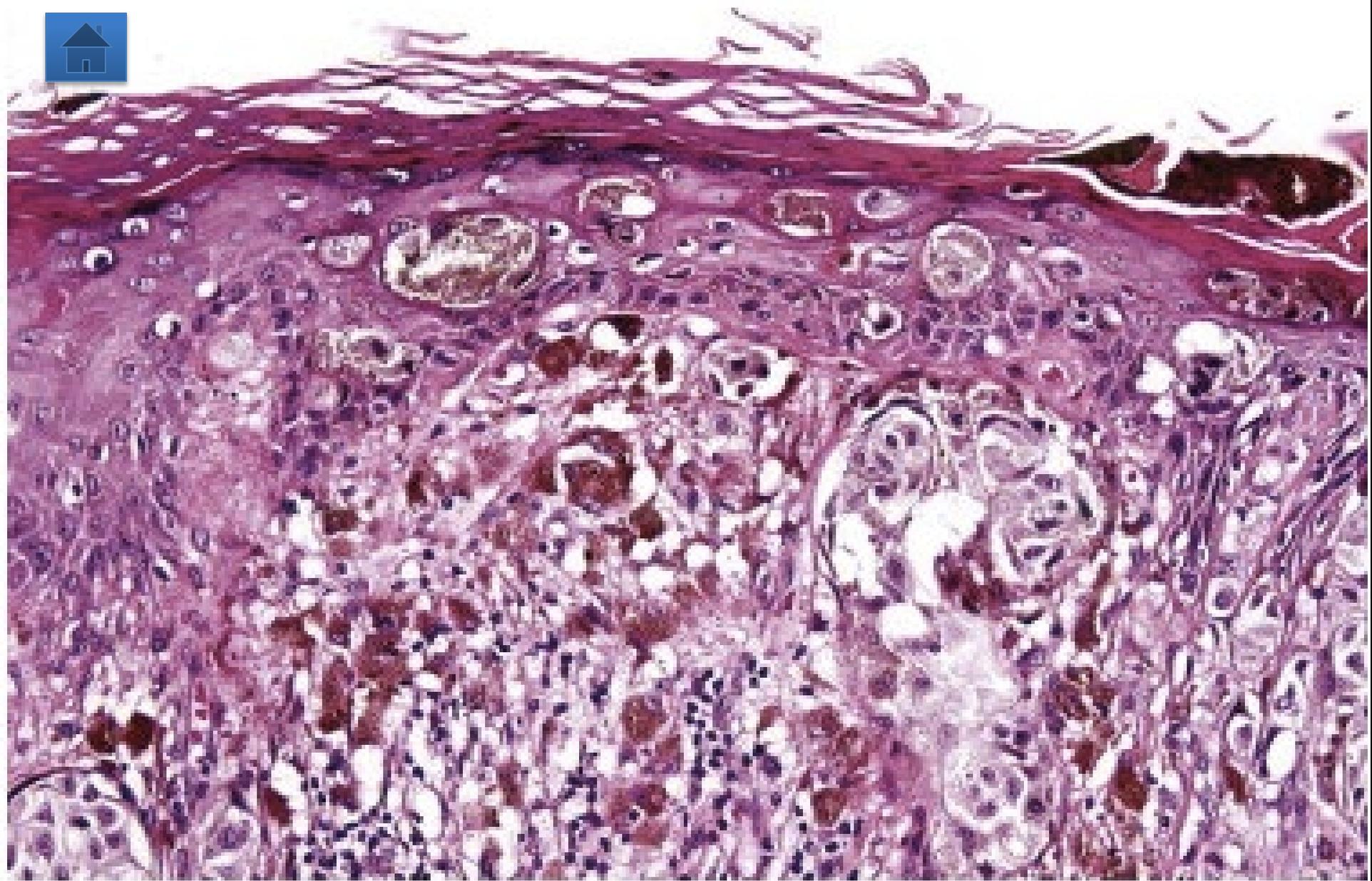
Brisk

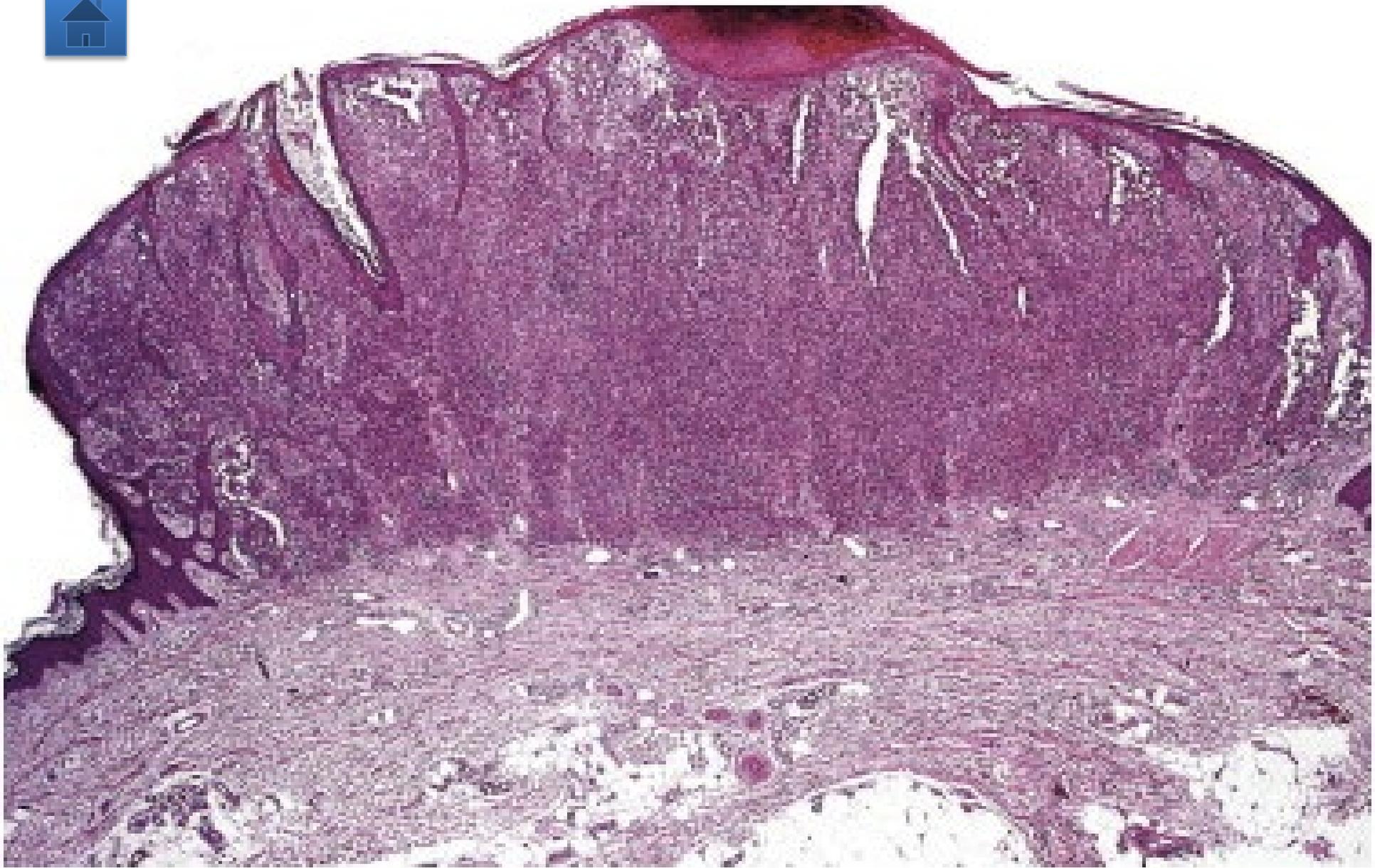
- Índice mitótico.
- Microsatelitosis.

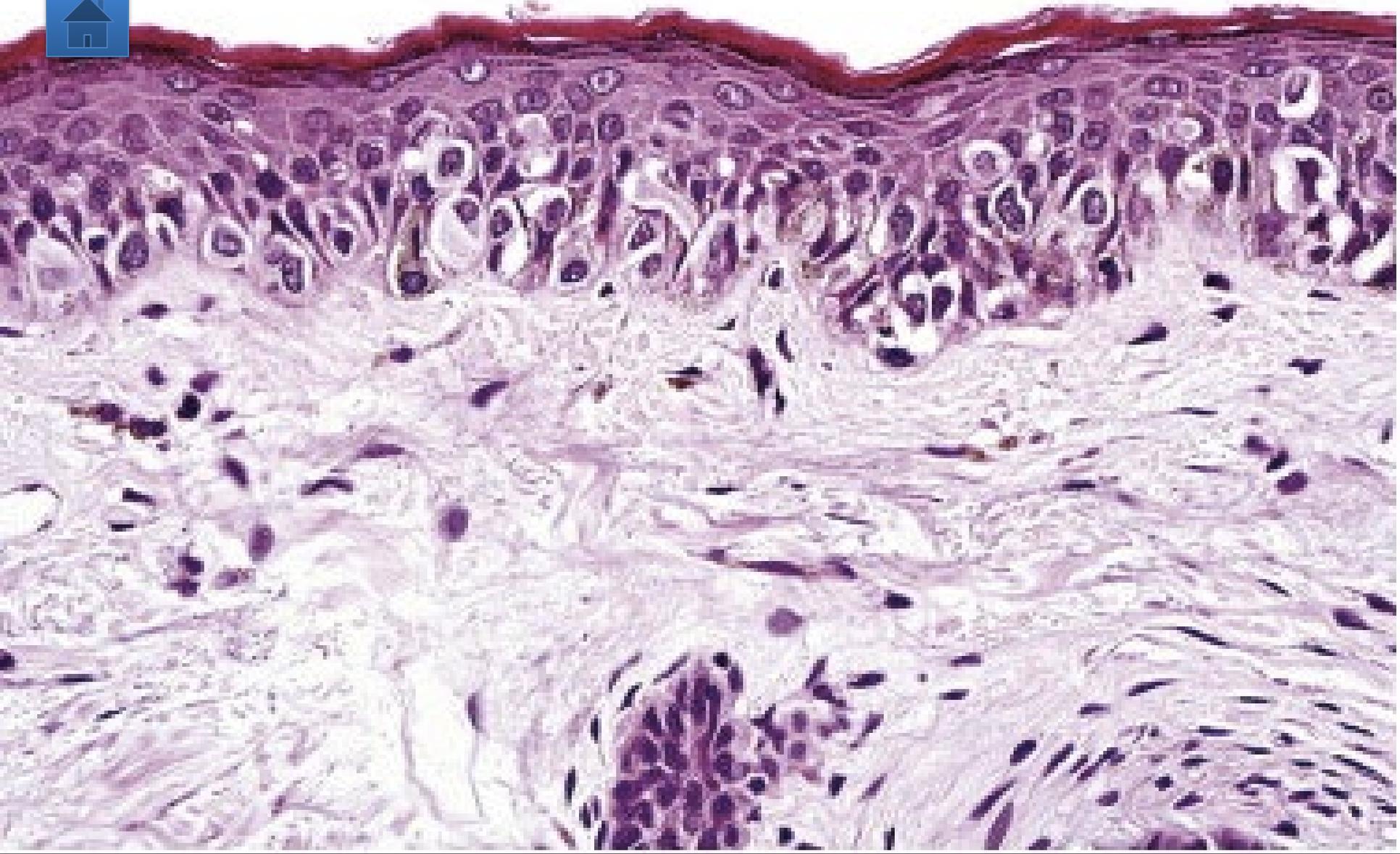
obtención de los mismos.

- TNM (AJCC).









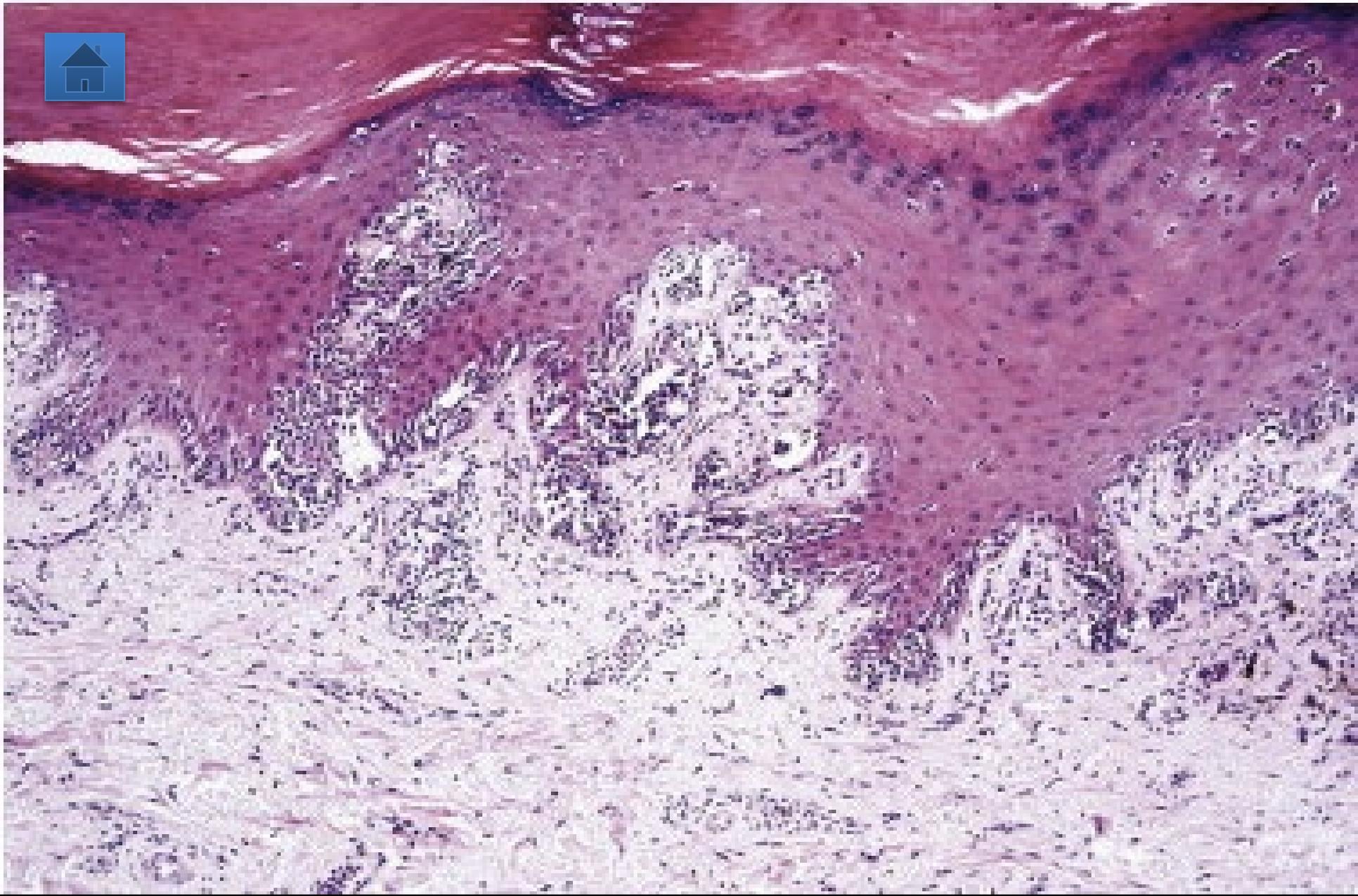


Tabla 4. Prevalencia de mutaciones en lesiones pigmentadas⁴⁵

Gen	Mecanismo	Frecuencia
NRAS	Mutación de activación.	56% en nevos congénitos.
	Q61R mutación más común	33% en primarios.
		26% en metástasis.
BRAF	Activación constitutiva.	66% en melanomas.
	V600E mutación más común	82% en nevos benignos.
PTEN	Inactivación por delección	30-40% en líneas celulares.
		10% en primarios.
P16 ^{INKa4}	Inactivación por mutación y delección	30-70% en melanomas.
APAF1	Inactivación por pérdida de heterogocidad y metilación.	42% en melanomas.
MITF	Amplificación	11% en primarios.
		15% en metástasis.
BCL-2	Amplificación	>90% en melanomas.
c-kit	Mutación por activación y amplificación	28% en melanomas en piel dañada por el sol.
		0-18% en nevos benignos.
TP53	Mutación por delección	1-5% en primarios.
		11-25% en metástasis.
AKT3	Activación	46-67% en melanomas esporádicos.
		4% en nevos benignos.
		23% en melanomas.
mTOR	Activación	77% en insitu melanomas.
		67% en melanomas invasivos.
		75% en metástasis.

15%

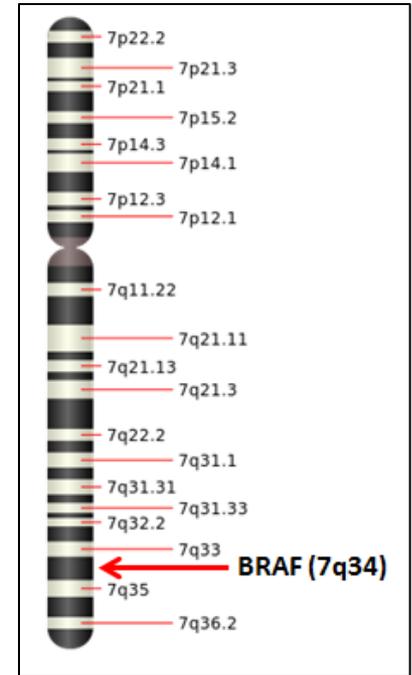
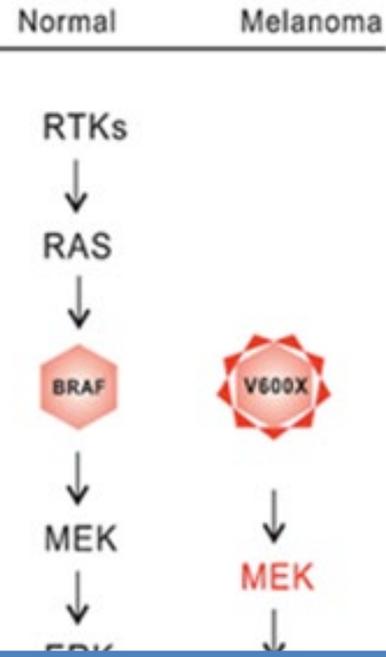
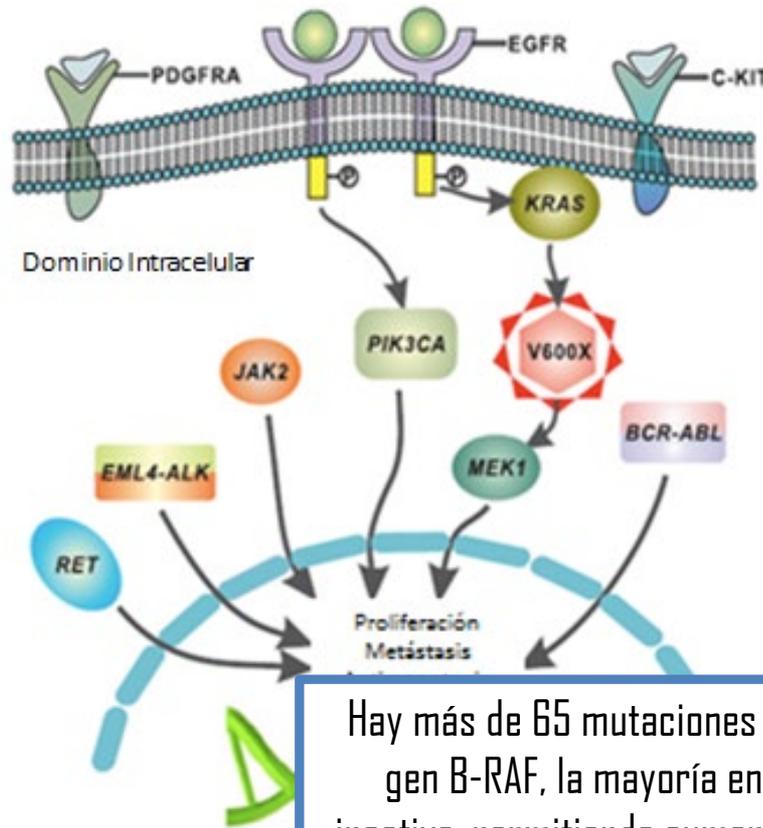
50%

En los
en los
oncog
epiteli
Los es
existe
celular
malign

aciones
1 de
ren que
tra-
ino

Nageatte Ibrahim, Frank G. Haluska, M 579.

RAS/RAF/MEK/ERK



Hay más de 65 mutaciones distintas en melanomas que afectan más de 30 codones en el gen B-RAF, la mayoría en el dominio cinasa => desestabilización en su conformación inactiva, permitiendo aumento en su isoforma activa => estimulación del BRAF **700 veces**.

BRAF V600E

Existen más de 75 mutaciones somáticas en el exón 15 del gen BRAF para melanomas



Sustitución puntual de una base (timidina por adenosina) en el nucleótido 1799
"T1779A".



Sustitución de valina por ácido glutámico en la posición 600 de la cadena de aminoácidos de su proteína expresada
"V600E".

Esta mutación se encuentra adyacente a serina 599 => la polaridad del "E" imita la polaridad de la "S"(p) => elimina la necesidad de fosforilación de BRAF-mutante => **activación constitutiva de la vía MAPK**

Tabla 5. Frecuencia relativa de mutaciones en el BRAF sometida por el Catálogo de mutaciones somáticas del Cáncer (COSMIC)⁷²

Localización de la mutación BRAF (por posición de amino-ácido y sustitución).	Porcentaje de todas las mutaciones en el gen BRAF.
V600E	93.70%
V600K	1.00%
K601 ^a	0.40%
G469A ^a	0.40%
D594G ^a	0.30%
V600R	0.30%
L597V ^a	0.20%

BRAF indica "v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1"; V, valina; E, ácido glutámico; K, lisina; G, glicina; R, arginina; L, leucina.

^aLa mutación listada es la sustitución de amino-ácido más común, mientras que el porcentaje representa todos los cambios de amino-ácidos en esa posición.

BRAF-mutante

PROPIEDAD

Localización

Frecuencia de melanoma.

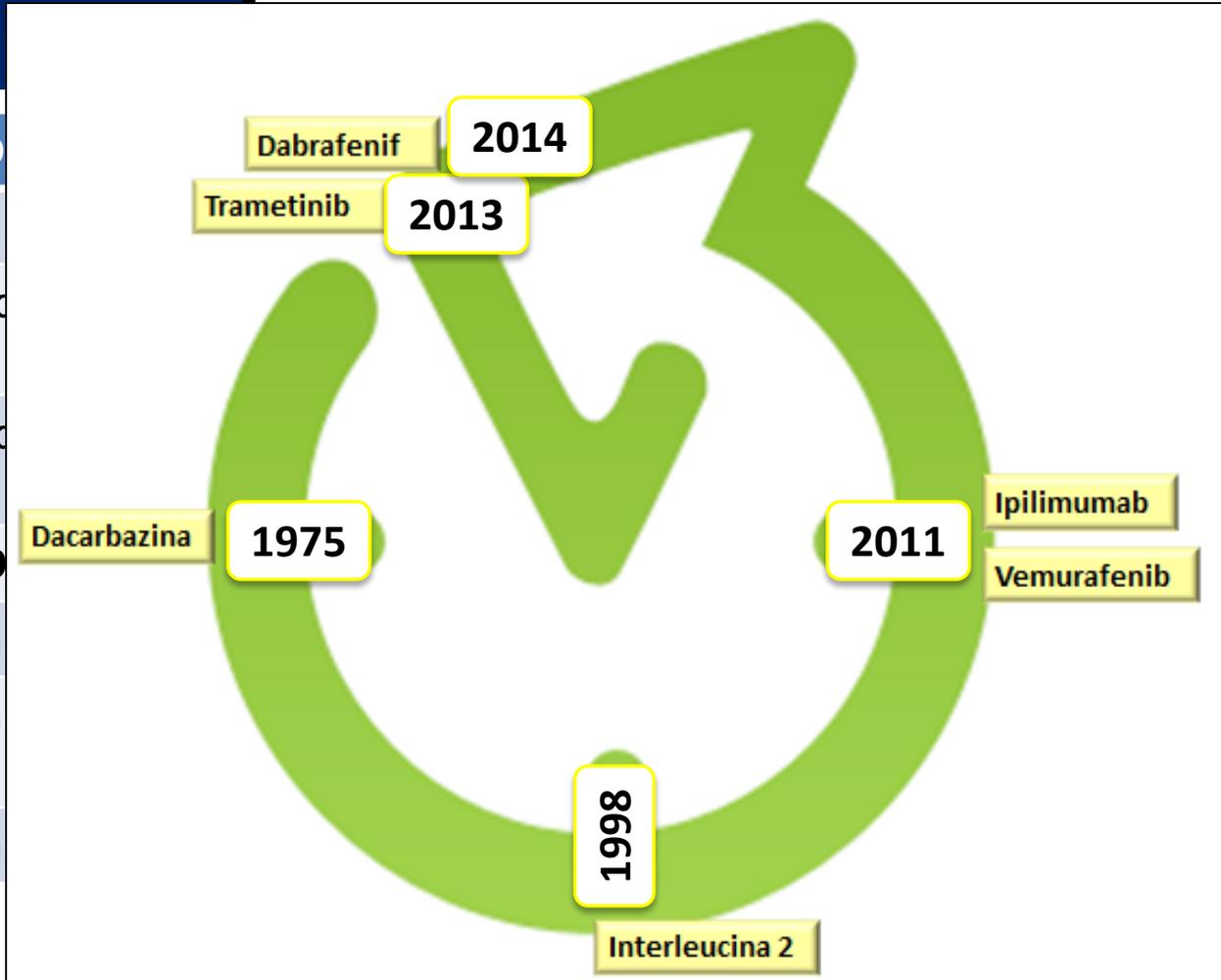
Frecuencia de mutaciones

IMPLICACIÓN

Respuesta a

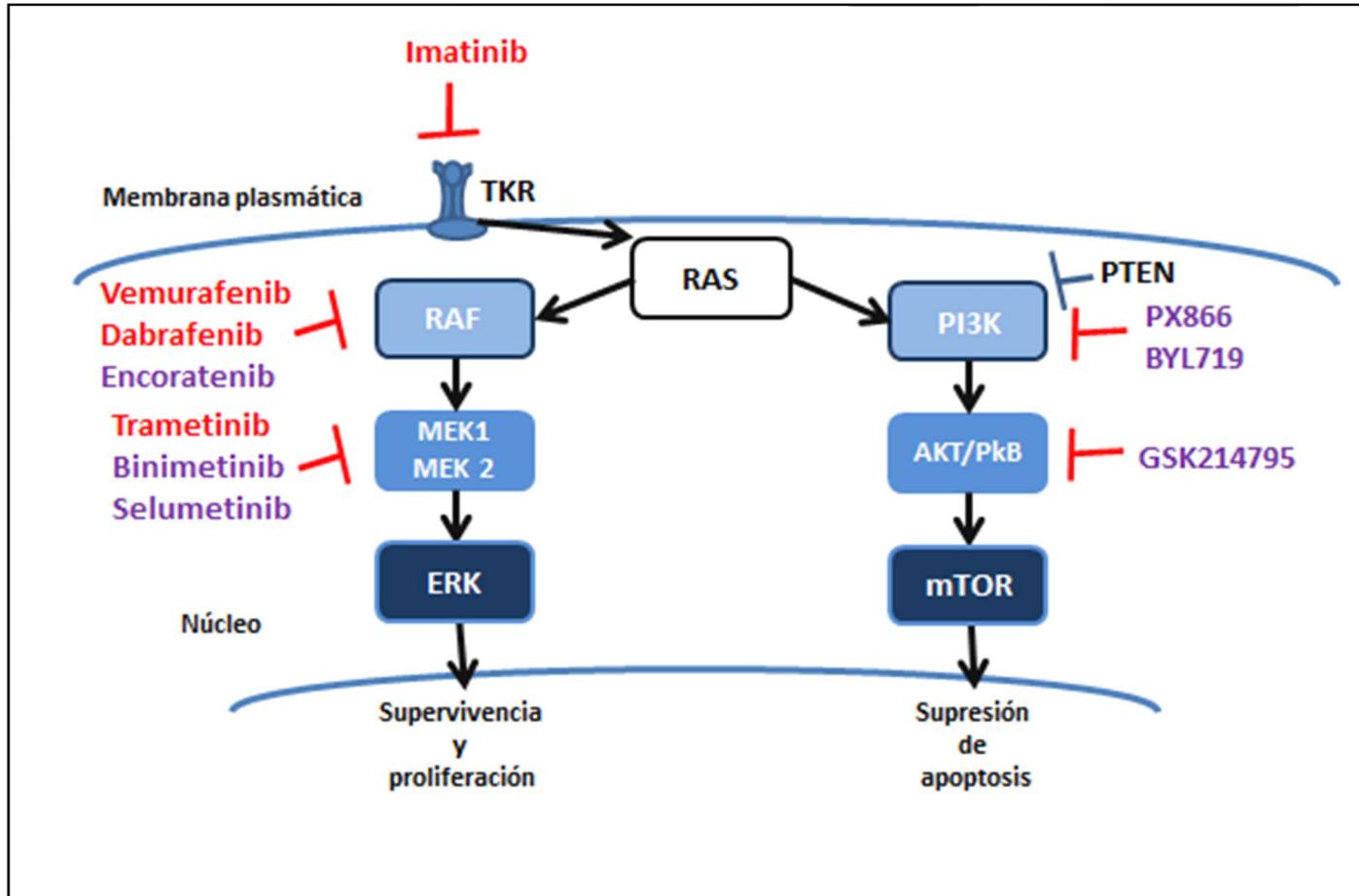
Respuesta a

Respuesta a



,
12),
, Falchook

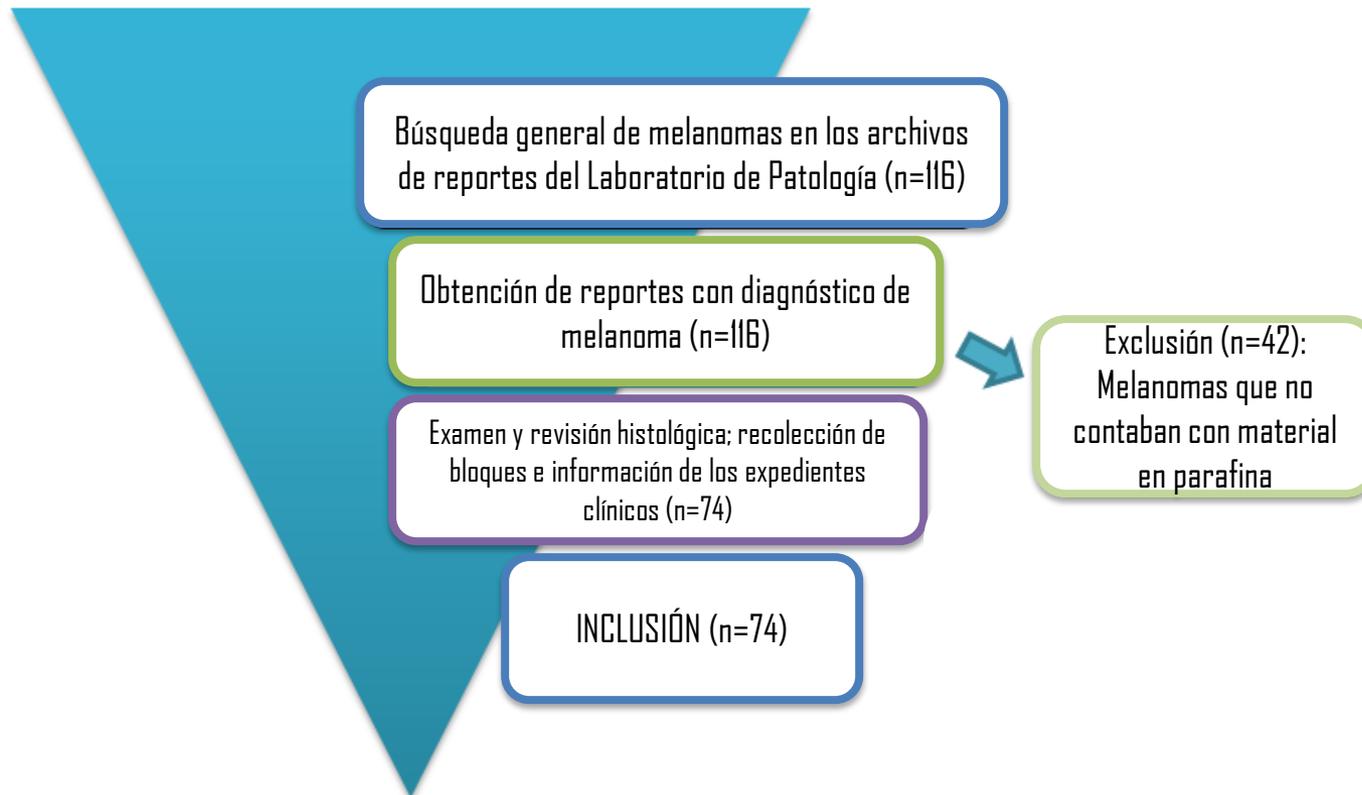
Terapias blanco



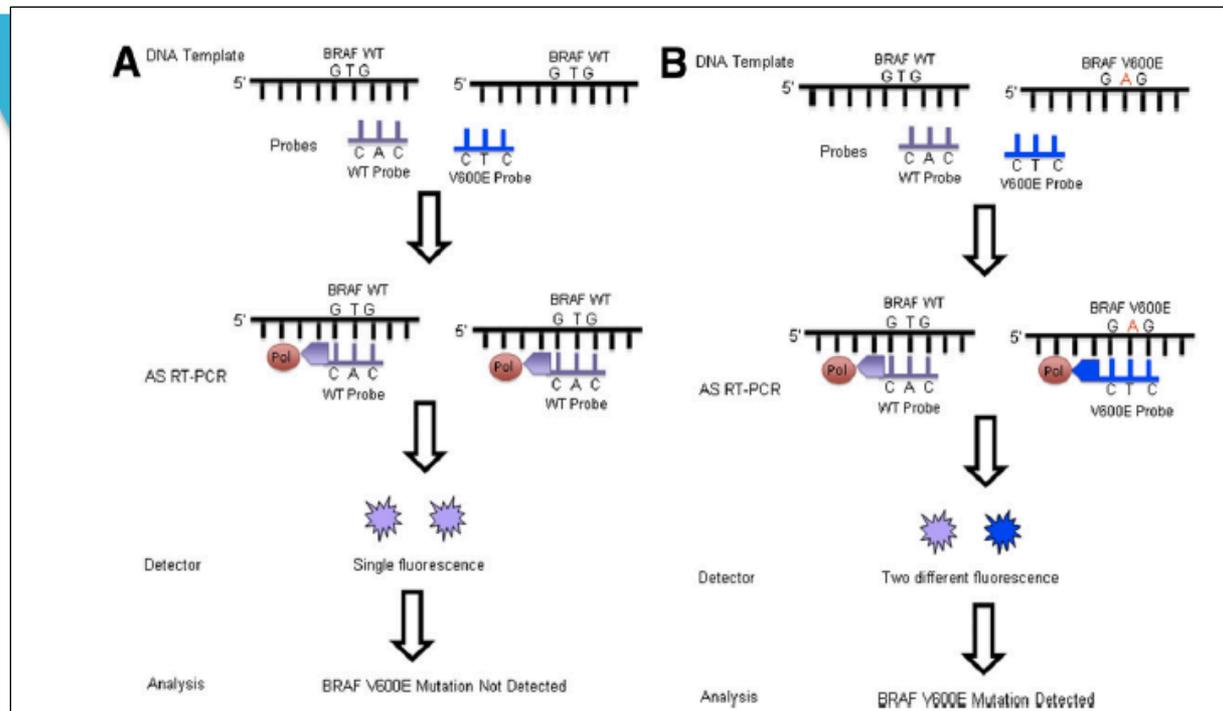
BRAF-mutante en el mundo

País	BRAF	BRAF ^{V600E}	Melanoma	Método	
EUA (n=138)	30.4%	21%	P/M	PCR-secuencial	Rubinstein et al
China (n=432)	25.5%	22.6%	Primarios	PCR-secuencial	LuSi et al
Uruguay (n=28)	Desconocido	78%	Primarios	PCR-RT	Mazzei ME et al
Colombia (n=81)	24.7%	24.7%	P/M	No especificado	Alicia Quiroga
Brasil (n=77)	Desconocido	70.10%	Primarios	PCR-secuencial	Inumaru et al
Australia (n=197) (n=308)	48% 46%	34.8% 35.5%	Metástasis Metástasis	PCR-secuencial	Long GV et al Menzies et al

Metodología



Biología molecular



PCR en tiempo real

“CTACTGTTTTTCCTTTACTTACTACACCTCAGATATATTTCTTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAG
GTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCC”

Inclusión y exclusión

Metodología

- Muestras tumorales de pacientes mexicanos con el diagnóstico anatomopatológico de melanoma (primario y/o metástasis).
- Cualquier tipo histológico y/o clínico de melanoma.
- Muestras estudiadas en el Laboratorio del Hospital San José Tec de Monterrey desde enero 01 de 1995 a diciembre 31 del 2012, de las cuales se cuente con expediente clínico y bloque de parafina.
- Bloque de parafina de mala calidad y/o ausente.
- Pacientes que no cuenten con nacionalidad mexicana en el expediente clínico.

Variables

Metodología

- ❖ La unidad primaria de observación lo representó el material del bloque de parafina y no existieron subgrupos de contraste.
 - Variables demográficas: número de control del reporte anatomopatológico, edad del paciente y sexo.
 - Variables clínicas: Sitio de la lesión y clasificación del tumor como primario o metastásico .
 - Variables histopatológicas: Subtipo histológico, Breslow, Clark, mitosis por mm², infiltrado linfocitario, ulceración y etapa clínica según la AJCC 7^{ma} edición.
 - Variables moleculares: Heterocigoto, homocigoto, negativo, desconocido y no analizado.

Análisis estadístico

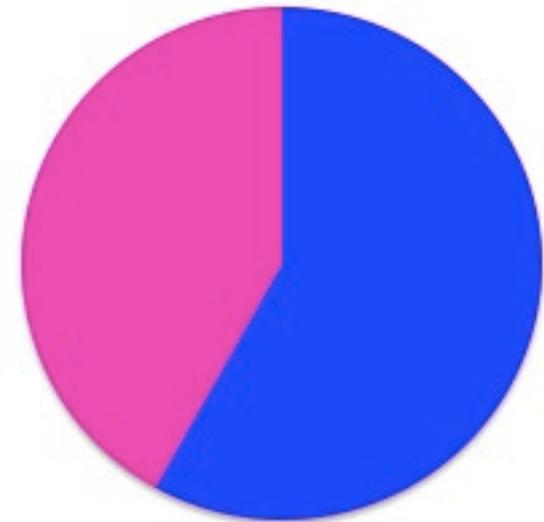
- ❁ El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando software especializado:
 - SPSS 22 y Excel.
- ❁ Para aquellas variables cuantitativas se utilizaron medidas descriptivas, como media y desviación estándar.
- ❁ En el caso de las variables categóricas se usaron proporciones.
- ❁ Para el caso de investigar asociación entre variables cualitativas y categorizadas se utilizaron tablas de contingencia (χ^2). En el caso de comparar grupos y que la variable fuera cuantitativa, se utilizó la T-test.

Resultados

“Los resultados expuestos reflejan una población étnicamente diversa, aleatoria en un lapso de tiempo específico”.

❁ Se obtuvieron un total de 74 especímenes quirúrgicos.

- Rango de edad: 16 a 79 años.
- Media de 52.9 años.



	Frecuencia	Porcentaje
♀	31	42%
♂	43	58%
Total	74	100%

Epidemiología

Tabla 11. Distribución por edad y sexo de melanoma maligno

Edad	Frecuencia			Frecuencia %			Edad versus Sexo (%)			Frecuencia Edad versus Sexo (%)		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T
Total	31	43	74	42%	58%	100%	100%	100%	100%	41.90%	58.10%	100%
65 o más	5	14	19	7%	19%	26%	16.10%	32.60%	25.70%	26.30%	73.70%	100%
Desconocido	1	2	3	1%	3%	4%	3.20%	4.70%	4.10%	33.30%	66.70%	100%

El promedio de edad en pacientes masculinos fue de 57.19 años y el de mujeres de 46.9 años. Se realizó un T-test evaluando la relación entre la edad y el sexo, el cual demuestra que la edad y el sexo son variables dependientes en el presente estudio ($p=0.006$).

Localización

Resultados

Tabla 13. Frecuencias de localización por presentación clínica.

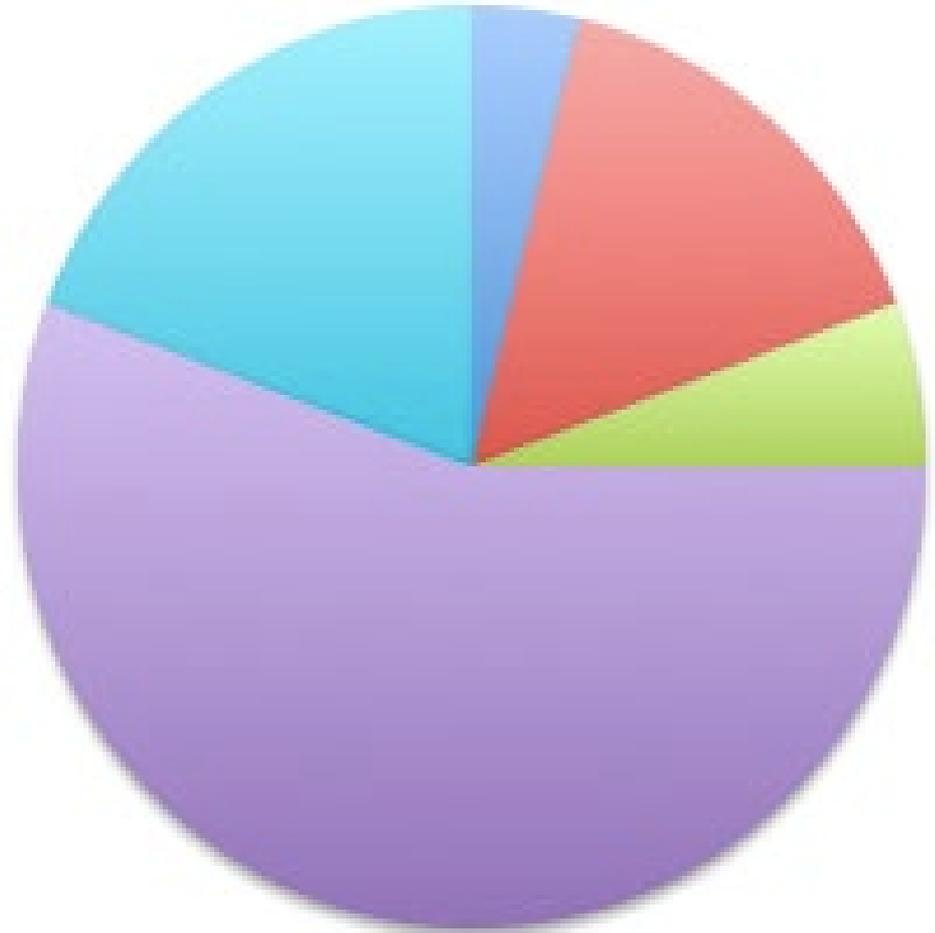
Localización	Frecuencia			% Total			% Primario / Metástasis		
	Metástasis	Primario	Total	Metástasis	Primario	Total	Metástasis	Primario	Total
Primario Desconocido	0	1	1	0%	1%	1%	0%	1%	1%

Aunque por los datos expuestos parecería que existe una relación estadísticamente significativa entre el sexo y la localización, el valor de $p=0.132$ en el T-test no resultó significativo, lo que refleja que en el presente estudio estas variables son independientes.

Ganglio	11	0	11	15%	0%	15%	55%	0%	15%
Fondo de saco	2	0	2	3%	0%	3%	10%	0%	3%
Hígado	2	0	2	3%	0%	3%	10%	0%	3%
Tejidos blandos	2	0	2	3%	0%	3%	10%	0%	3%
Esófago	1	0	1	1%	0%	1%	5%	0%	1%
Pulmón	1	0	1	1%	0%	1%	5%	0%	1%
SNC	1	0	1	1%	0%	1%	5%	0%	1%
TOTAL	20	54	74	27%	73%	100%	100%	100%	100%

Tipos histológicos (n= 52)

	Frecuencia	Porcentaje
In situ	2	4
Acral	8	15
Léntigo Maligno	3	6
Nodular	29	56
Superficial	10	19
Total	52	100



- In situ
- Acral
- Lentigo maligno
- Nodular
- Superficial

Subtipo histológico

Resultados

Tabla 16. Relación sitio anatómico versus subtipo histológico.

	Cabeza y cuello	Extremidad superior	Extremidad Inferior	Otros	Total
In situ	0% (0)	12.5% (1)	0% (0)	8.3% (1)	3.8% (2)
Acral	0% (0)	12.5% (1)	38.8% (7)	0% (0)	15.3% (8)
Léntigo maligno	7.1% (1)	12.5% (1)	5.5% (1)	0% (0)	5.7% (3)
Nodular	57.1% (8)	37.5% (3)	55.5% (10)	66.6% (8)	55.7% (29)
Superficial	35.7% (5)	25% (2)	0% (0)	25% (3)	19.2% (10)
Total	14 (100%)	8 (100%)	18 (100%)	12 (100%)	52 (100%)

HISTOPATOLOGÍA

Resultados

Tabla 17. Relación parámetros histopatológicos versus sexo.

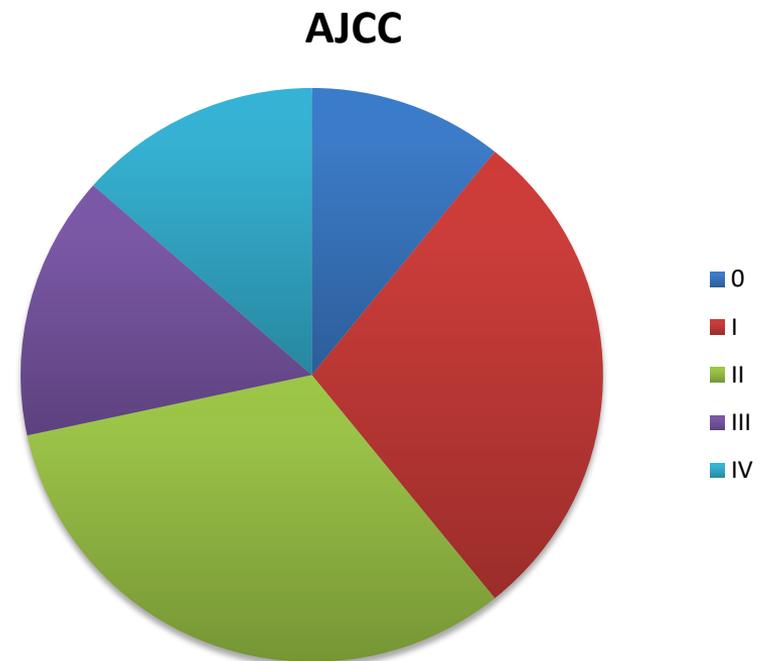
Parámetro histopatológico		Frecuencia			Frecuencia %		
		Sexo		Total	Sexo		Total
		F	M		F	M	
Breslow	<1.0	12	12	24	50%	40%	44%
	1.01-2.0	3	5	8	13%	17%	15%
	2.01-4.0	8	11	19	33%	37%	35%
	>4.0	1	2	3	4%	7%	6%
Total		24	30	54	100%	100%	100%
<p>En los melanomas estudiados, aquellas muestras con Breslow mayor a 2.0 mm exhiben ulceración hasta en un 62.5%. Se realizó una prueba X^2, la cual resultó estadísticamente significativa al 5% ($p= 0.028$), demostrando que en el presente estudio, la ulceración y el índice de Breslow son variables dependientes.</p>							
Total		23	30	53	100%	100%	100%
Clark	I	4	2	6	17%	7%	12%
	II	6	11	17	26%	38%	33%
	III	10	12	22	43%	41%	42%
	IV	0	3	3	0%	10%	6%
	V	3	1	4	13%	3%	8%
Total		23	29	52	100%	100%	100%
Mitosis	<1	8	8	16	35%	27%	30%
	1	6	8	23	26%	27%	43%
	>1	9	14	14	39%	47%	26%
Total		23	30	53	100%	100%	100%

Etapa clínica

Resultados

Tabla 19. AJCC.

AJCC	F	M	Total
0	4	2	6
I	10	11	21
II	8	16	24
III	5	6	11
IV	3	7	10
Total	30	42	72
0	13%	5%	8%
I	33.30%	26.10%	30%
II	26.60%	38%	33.00%
III	16.60%	14.20%	15.20%
IV	10%	16.60%	13.80%
Total	100%	100%	100%



Genotipificación

Resultados

Tabla 20. Resultados de PCR en tiempo real.

El promedio de Breslow en las muestras analizadas es de 2.1 mm, mientras que en las muestras no analizadas es de 0.88 mm. La diferencia del espesor de Breslow, medido en milímetros, entre muestras analizadas y no analizadas, es de 1.22, por lo que se realizó un T-test, el cual arrojó un valor de $p=.005$, que es estadísticamente significativo y refleja que el tamaño tumoral es una variable dependiente con la amplificación y obtención de resultados por PCR en tiempo real.

No analizada (B)	4	5%
No analizada (N)	8	11%
Total	74	100%

Genotipificación

Resultados

Tabla 22. Genotipo y prevalencia del gen BRAF.

Gen BRAF	Frecuencia	%	Genotipos de BRAF	Frecuencia	%
Mutante	37	60%	BRAF-Desconocido	31	50%
			BRAF V600E	6	9.60%
Salvaje	25	40%	Salvaje	25	40.30%
Total	62	40%	Total	62	100%

La prevalencia de mutaciones en el gen BRAF en el exón 15 para la muestra de melanomas estudiados es del 59.6% y la prevalencia de la mutación puntual BRAF^{V600E} en esta es del 9.6%. La mutación puntual BRAF^{V600E} representa el 16.11% de las mutaciones en el gen BRAF/exón 15.

Tabla 23. Asociación del genotipo BRAF mutante con características clínico-patológicas del melanoma.

Variable Clínico-patológica	BRAF-mutante	BRAF Silvestre	Valor p
Edad	53.9 +/- 13.5	52.1 +/- 20.7	0.717 ^a
Sexo M (%)	59%	60%	0.967 ^a
Primario/Metastásico P (%)	73%	72%	0.935 ^a
Nodular (N)	17	10	0.511 ^b
Extensión superficial (N)	4	4	
Acral (N)	4	3	
Lentigo maligno (N)	2	0	
In situ (N)	0	1	
Breslow	2.1 +/- 2.1	2.2 +/- 1.9	.990 ^a
Ulceración P (%)	40.70%	27.80%	.373 ^b
Mitosis (>1mm ²)	14	8	.237 ^b
Infiltrado linfocítico (presente)	24	17	.412 ^b
I	11	7	1.590 ^b
II	15	8	
III	5	5	
IV	5	3	
Cabeza y Cuello (N)	4	7	0.218 ^b
Extremidades (N)	15	7	
Tronco (N)	5	4	

^a Para evaluación de los siguientes parámetros se utilizó T-Test.

^b Para evaluación de los siguientes parámetros se utilizó X²

Discusión

❁ Datos clínicos coinciden con:

- Información reportada en la bibliografía angioplásica para melanoma.

Alfeirán-Ruiz A, Escobar-Alfaro G. Epidemiología del melanoma de piel en México. Rev Inst Nal Cancerol 1998;44:168-174.
Magaña-García M. Melanoma maligno: aspectos clínicos en la población mexicana. Dermatología 1991;35:313.
Rodríguez CS, Labastida AS. Aspectos epidemiológicos del melanoma en México. Cir Cir 1994;61:64.

- Datos reportados en el estudio de Zen et al, quienes revisaron 39,

Media de 52.9 años contra 50 años en EUA.
Edad de presentación una década menor en pacientes femeninos contra masculinos (42.9 contra 57.2 años).

- Info

Sitio de localización más común extremidad inferior.
En mujeres el sitio de localización más común es la extremidad inferior.
Melanoma nodular fue el subtipo más común, en México representa hasta el 49% de los melanomas.

Discusión

Parámetros histopatológicos:

- No existe bibliografía suficiente en México que trate sobre el estudio histopatológico de melanomas.
 - El 50% de las muestras posee un Breslow <1.0 mm, al igual que el registrado en el GEA en una serie de 165 pacientes. (*Karams-Orantes y cols*).
 - Serie de 252 casos de Alfeirán-Ruiz y colaboradores de Cancerología el nivel de Breslow más común fue el III y IV.
 - La mayoría de los melanomas en pacientes latinos y mexicanos no se encuentran ulcerados.
 - No existe bibliografía que hable sobre el número de mitosis e infiltrado inflamatorio.

Discusión

País	BRAF	BRAF ^{V600E}	Melanoma	Método	
EUA (n=138)	30.4%	21%	P/M	PCR- secuencial	Rubinstein et al
China (n=432)	25.5%	22.6%	Primarios	PCR- secuencial	LuSi et al
Uruguay (n=28)	Desconocid o	78%	Primarios	ASO-PCR	Mazzei ME et al
Colombia (n=81)	24.7%	24.7%	P/M	No especificado	Alicia Quiroga
Brasil (n=77)	Desconocid o	70.10%	Primarios	PCR- secuencial	Inumaru et al
Australia (n=197) (n=308)	48% 46%	34.8% 35.5%	Metástasis Metástasis	PCR- secuencial	Long GV et al Menzies et al

Conclusiones

- ✿ En el presente estudio se cumplieron los objetivos establecidos:
 - Determinación de la prevalencia de mutaciones a nivel del gen BRAF en el exón 15 y la mutación puntual BRAF^{V600E}.
 - Asociación entre el grupo BRAF mutante y las variables clínico-patológicas.
 - Descripción de datos clínico-patológicos.
- ✿ Establecer la pauta de metodología reproducible para realización de estudios similares en México.
- ✿ Comprobación de hipótesis planteada.

Prospectivas

- ❖ Los resultados obtenidos presentan una base de conocimiento que sugiere el comportamiento de la población de interés.
 - Aumento de número de muestras.
 - Privado/público.
 - Nivel nacional.
- ❖ Análisis genético ampliado:
 - BRAF / NRAS.
 - Método de pirosecuenciación Sanger®.

MUCHAS GRACIAS...