

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

“CORRELACIÓN ENTRE ALTERACIONES GENÉTICAS Y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO HUMANO TRATADOS CON LA VACUNA CSF-470 O CON INTERFERÓN ALFA-2B”

Bianchi, Agustina – LU: 1051736

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dr. Mordoh, José, Fundación Instituto Leloir- IIBBA, CABA

Co-Tutor Externo:

Lic. Barón, Antonela, Fundación Instituto Leloir- IIBBA, CABA

Co-Tutor Interno:

Dr. Rivarola, Máximo, Fundación UADE, CABA

Colaborador:

Dra. Bravo, Inés A., Hosp. Inter. Gral. de Agudos “Eva Perón”, San Martín

Octubre 2017



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

Hoy le quiero decir gracias a todos lo que me acompañaron en este proyecto, a los que estuvieron en el día a día, y a aquellos que con sus pequeños actos hicieron que esta tesis sea posible.

Gracias al Dr. Mordoh por confiar en mí y permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Gracias a mis compañeras de laboratorio, Flor, Sole, Sofi y Anto por responder cada una de mis preguntas, una y otra vez, por las risas, por los mates. En especial gracias a Anto, por estar en todo momento y guiarme en cada decisión. Gracias a todo FIL. Gracias a las chicas del CIO. Gracias a la Dra. Bravo y Alejandra. Gracias a la Profe Dra. Adriana Pérez.

Gracias a mi familia. A Luli y Ro por estar en todos mis estados anímicos, por esperarme mil veces con la comida lista, por todo... Gracias a mis papás por apoyarme siempre, por ayudarme a alcanzar mis metas. Gracias a Rober, a mis abuelos y a la tía Gilda.

Gracias a mis amigos de la Facu y a mis amigos de siempre.

Gracias a Gimi por caminar conmigo de principio a fin de este proyecto.

Una vez más... ¡¡Gracias!!

RESUMEN

Correlación entre alteraciones genéticas y la evolución clínica de pacientes con melanoma cutáneo humano tratados con la vacuna CSF-470 o con interferón alfa 2b

El melanoma cutáneo humano (MCH) es el tipo de cáncer de piel más letal. Si bien es generalmente resistente tanto a la quimio como radioterapia, es el tumor inmunogénico por excelencia. En nuestro laboratorio se ha desarrollado la vacuna terapéutica anti-MCH, CSF-470, compuesta por cuatro líneas celulares irradiadas de MCH coadyuvadas con BCG y GM-CSF, que ha sido evaluada contra interferón alfa 2b (INF- α 2b) en un estudio clínico de fase II. CFS-470 tuvo mejores resultados que INF- α 2b en cuanto a sobrevida libre de metástasis a distancia (por sus siglas en inglés DMFS) y calidad de vida.

Avances recientes en las técnicas de secuenciación han permitido una mejor comprensión del efecto de las mutaciones sobre la inmunidad antitumoral. El objetivo de este trabajo fue explorar si existen diferencias en cuanto al perfil de alteraciones frecuentes en genes *driver*, entre los tumores de pacientes que responden al tratamiento con las inmunoterapias CSF-470 o INF- α 2b, y aquellos pacientes que no lo hacen. Para ello se utilizaron doce biopsias de pacientes estadio III de MCH, tratados con CSF-470 (n=8); INF- α 2b (n=3) o no tratados (n=1), que se clasificaron en dos grupos dependiendo de la DMFS. Las mutaciones frecuentes en los genes BRAF, NRAS, PTEN, CDKN2A, TP53, RAC1 y el promotor de TERT, se evaluaron por Nested-PCR y posterior secuenciación por el método de Sanger. Se realizó análisis del número de copias de los genes CDKN2A y PTEN por Hibridación Fluorescente in situ (FISH). Posteriormente se relacionó el perfil genético obtenido con la DMFS de cada paciente.

Se encontró que el 67% (8/12) de los tumores contenían la mutación BRAF^{V600E}, mientras que solo un tumor presentó las alteraciones NRAS^{Q61} y NRAS^{G12}. Mutaciones en TP53 se hallaron en 33% (4/12) de los tumores y se observó alguna alteración en PTEN en el 42% de ellos. El 33% de los pacientes presentó alguna alteración en CDKN2A y solo uno sufrió una mutación en el promotor de TERT. No se encontraron diferencias en cuanto a la ocurrencia de mutaciones entre los pacientes que se encuentran libres de metástasis a distancia y aquellos que han progresado. Esto sugiere que debe incrementarse el número y profundidad de análisis de las muestras, para evaluar si existe un correlato entre el genotipo y la respuesta a la inmunoterapia.

ABSTRACT

Correlation of the most frequent genetic alterations and clinical evolution of human cutaneous melanoma patients treated with CSF-470 vaccine or interferon alpha 2b

Human cutaneous melanoma (HCM) is the deadliest form of skin cancer. It is relatively resistant to both chemotherapy and radiotherapy; however, HCM is a highly immunogenic tumor. A therapeutic vaccine anti-HCM, CSF-470, composed of four HCM irradiated cell lines and adjuvated with GM-CSF and BCG, has been developed in our laboratory. CSF-470 was tested against interferon alpha 2b (INF- α 2b) in a phase II clinical study. CSF-470 had better results than INF- α 2b regarding distant metastasis-free survival (DMFS) and quality of life.

HCM is the highest mutated cancer. Recent advances in sequencing techniques have provided a deeper understanding of the immune effects of genomic mutations. The aim of this work was to evaluate whether there is any relationship between alterations in some relevant driver genes of each patient's tumor and disease progression. For this purpose, biopsies of twelve stage III patients treated with CSF-470 (n=8), INF- α 2b (n=3) or non-treated (n=1) were used. These patients were classified into two groups depending on distant metastasis-free survival (DMFS). Frequent mutations in the BRAF, NRAS, PTEN, CDKN2A, TP53, RAC1 genes and TERT promoter were analyzed by Nested-PCR and subsequent sequencing by the Sanger method. In addition, analysis of CDKN2A and PTEN copy number variations was evaluated by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH). Then, the genetic profile was related with the DMFS of each patient.

It was found that 67% (8/12) of the total tumors harbored BRAF^{V600E} mutations, while only one of the tumors had NRAS^{Q61} and NRAS^{G12} mutations. TP53 mutations were found in 33% (4/12) of tumors and PTEN alterations were observed in 42% (5/12) of them. 33% (4/12) of the tumors presented some alteration in CDKN2A and one patient had a mutation in TERT promoter. No difference in the occurrence of mutations was found between distant metastasis-free patients and progressed patients. Consequently, this suggests that a larger group of biopsies should be analyzed in more depth, in order to evaluate if there is any correlation between the genotype and response to immunotherapy.

Abreviaturas

ADN ácido desoxirribonucleico

AJCC Comité conjunto Americano del Cáncer (*American Joint Committee on Cancer*)

ALT alteración

ACGT *The Cancer genome Atlas*

BRAF v-raf sarcoma murino viral oncogén homólogo B (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*)

BSA albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CDKN2A quinasa dependiente de ciclina 2A (*cyclin dependent kinase 2a*)

CTLA-4 antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)

DEL delección

DMEM medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagles Medium*

DMFS supervivencia libre de metástasis a distancia (*distant free metastasis survival*)

DMSO dimetil sulfóxido

dNTP desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

Fw cadena *forward*

GPCR receptor acoplado a proteína G (*G protein-coupled receptors*)

HLA antígeno leucocitario humano

hs horas

IFN interferón

Lof pérdida de función (*Loss of function*)

MAPK proteínas kinasas activadas por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MCH Melanoma cutáneo humano

MDA antígenos de diferenciación melanocítica

min minutos

MM medio melanoma

mRNA ácido ribonucleico mensajero

MUT mutación

NF1 neurofibromatosis tipo 1 (*neurofibromatosis type 1*)

NRAS Neuroblastoma viral oncogén homólogo RAS (v-ras) (*Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*)

OS supervivencia total (*overall survival*)

PBS buffer fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PD-1 proteína de muerte programada 1 (*Programmed cell Death 1*)

PI3K Fosfoinositol 3-quinasa (*Phosphoinositide 3-kinase*)

PTEN homólogo de fosfataza y tensina (*phosphatase and tensin homolog*)

RAC1 ras relacionados con sustrato de toxina botulínica C3 1 (*Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*)

Rv cadena *reverse*

SFB suero fetal bobino

TIL linfocitos infiltrantes de tumor (*tumor infiltrating lymphocytes*)

TKR receptor tirosina quinasa (*receptor tyrosine kinase*)

UV ultravioleta

WT *wild type*

CONTENIDOS

Contenidos

Abreviaturas.....	7
Estructura del trabajo.....	11
1. Introducción y Objetivos	13
2. Antecedentes.....	16
3. Hipótesis.....	48
4. Metodología.....	50
5. Resultados.....	69
6. Discusión	105
7. Conclusión.....	114
8. Bibliografía.....	116

ESTRUCTURA DEL TRABAJO

Este trabajo incluye las siguientes secciones:

En primer lugar Introducción y Objetivos, en la cual se detalla la relevancia del tema en estudio, así como los objetivos, general y específicos. En segundo lugar la sección Antecedentes, dedicada a la descripción de trabajos ya publicados en el tema. Luego, en la sección Hipótesis, se plantean los interrogantes que se buscó validar con los resultados obtenidos. Seguido a ello se encuentra el apartado Metodología, donde se describen los materiales y procedimientos experimentales utilizados. A continuación, se presentan los resultados obtenidos, seguido de la Discusión de los mismos y las Conclusiones a las cuales se abordaron. Finalmente, en la sección Bibliografía se citan los trabajos consultados para la redacción de los antecedentes y la discusión de los resultados de este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN: Relevancia del estudio

El melanoma cutáneo humano (MCH) es un tipo de cáncer de piel que se genera a partir de los melanocitos, células que producen melanina, responsables de la pigmentación y protección contra el daño por radiación UV (Miller and Mihm 2006).

El MCH es uno de los pocos tumores malignos cuyas tasas de incidencia y mortalidad han estado en aumento durante los últimos 30 años. En nuestro país ocurren alrededor de 500 muertes/año a causa de MCH (Latorre C., Loria F. 2011). Según la Sociedad Americana Contra El Cáncer, para el año 2017 aproximadamente 87.110 nuevos casos serán diagnosticados, y aproximadamente 9.730 personas morirán a causa de esta enfermedad en los Estados Unidos (Siegel, Miller, and Jemal 2017).

El MCH diagnosticado en estadios tempranos es curado en la mayoría de los casos por extirpación quirúrgica. No obstante, en estadios avanzados presenta muy mal pronóstico, siendo generalmente resistente a tratamientos como radio y quimioterapia (Tímár et al. 2016). En los últimos años se han producido importantes avances en su tratamiento; sin embargo, presenta un tiempo de supervivencia media de 8-9 meses y una tasa de supervivencia a cinco años entre 5 y 19% (Sandru et al. 2014).

Si bien el MCH es resistente a las terapias convencionales, es el tumor inmunogénico por excelencia. En nuestro laboratorio se ha desarrollado la vacuna terapéutica anti-MCH CSF-470, compuesta por cuatro líneas celulares irradiadas de MCH coadyuvadas con BCG y GM-CSF, que ha sido ensayada versus interferón alfa-2b en un estudio clínico de fase II. Hasta el momento se han tratado treinta y un pacientes, estadios IIB-IIC-III de MCH post-cirugía. La vacuna CSF-470 ha tenido resultados superiores al interferón alfa-2b; aunque algunos pacientes con crecimiento rápido de su tumor no alcanzan a ser protegidos (Mordoh et al. 2017).

El MCH es el tipo de cáncer con mayor carga mutacional (>10 mutaciones/Mb) (Lawrence et al. 2013). Avances recientes en las técnicas de secuenciación han incrementado sustancialmente el conocimiento de fenómenos moleculares claves para la génesis y desarrollo de la enfermedad. Así como también, han permitido una mejor comprensión del efecto de las mutaciones sobre la inmunidad antitumoral. Algunas alteraciones moleculares pueden tener impacto en el microambiente tumoral, favoreciendo la evasión inmune; lo cual

en última instancia, podría influir la respuesta a la inmunoterapia (Johnson et al. 2015; Khalili et al. 2012; Peng et al. 2016; Vu et al. 2015).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

- Correlacionar las alteraciones genéticas frecuentemente asociadas a MCH con la evolución clínica observada en pacientes con la enfermedad en tratamiento experimental con la vacuna CSF-470 o con interferón alfa-2b en dosis intermedias. De hallarse un patrón de mutaciones que correlacione con la respuesta a estos tratamientos, ello permitiría predecir la evolución clínica de los pacientes.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de mutaciones frecuentemente asociadas a MCH por secuenciación de biopsias tumorales de pacientes con la enfermedad.
- Determinar las variaciones del número de copias en los genes frecuentemente alterados en MCH a través de hibridación fluorescente *in situ*.
- Correlacionar el perfil de alteraciones genéticas obtenidas de las biopsias tumorales con la evolución clínica de los pacientes tratados con la vacuna CSF-470 o con interferón alfa-2b.

2. ANTECEDENTES

2.1. MELANOMA CUTÁNEO HUMANO

2.1.1. Generalidades

El melanoma cutáneo humano (MCH) es un tipo de cáncer de piel que se genera a partir de la transformación maligna de los melanocitos; células que se encuentran principalmente en la piel, donde se especializan en la producción de melanina, pigmento que da color a la piel y el pelo. Los melanocitos se originan a partir de progenitores de la cresta neural que migran a la piel durante el desarrollo embrionario. En la piel residen en la capa basal de la epidermis y en los folículos pilosos, donde cumplen un rol clave en la protección del ADN contra el daño causado por la radiación UV (Gray-Schopfer, Wellbrock, and Marais 2007). La transformación maligna que lleva al desarrollo de MCH es multifactorial e incluye: una historia familiar de melanoma; la presencia de lunares atípicos, grandes o numerosos (más de 50); la elevada exposición a radiación UV (solar o de camas solares); así como también la sensibilidad al sol. El riesgo de desarrollar MCH está asociado a la exposición solar intensa e intermitente, y se ve incrementada en personas de piel y cabellos claros. También pueden encontrarse en riesgo personas que presenten el sistema inmune suprimido (Chudnovsky, Khavari, and Adams 2005; Jhappan, Noonan, and Merlino 2003; Miller and Mihm 2006).

El MCH diagnosticado en estadios tempranos es curado en la mayoría de los casos mediante extirpación quirúrgica. En estadios avanzados es generalmente resistente a tratamientos médicos como radioterapia y quimioterapia (Tímár et al. 2016), donde presenta muy mal pronóstico, con un tiempo de sobrevida media de 8-9 meses y una tasa de sobrevida a cinco años entre 5 y 19% (Sandru et al. 2014).

2.1.2. Incidencia del melanoma cutáneo humano

El MCH representa menos del 5% de los tumores dérmicos, pero es el causante de más del 75% de las muertes por cáncer de piel. Es uno de los pocos tumores malignos cuyas tasas de incidencia y mortalidad han estado en aumento durante los últimos 30 años en muchas partes del mundo; particularmente en la población blanca (Sandru et al. 2014; Siegel, Miller, and Jemal 2016). Aunque el riesgo de padecer MCH aumenta con la edad, es uno de los tumores más comunes entre los adultos jóvenes (mujeres principalmente). Para el año 2017 aproximadamente 87.110 nuevos casos serán diagnosticados, y aproximadamente 9.730

personas morirán a causa de esta enfermedad en los Estados Unidos (Siegel, Miller, and Jemal 2017).

En la Argentina son escasos los datos de incidencia de MCH. En el período 1985-89, la tasa cruda de mortalidad por MCH en el país, para ambos sexos, fue de 0,7 defunciones/100.000 personas por año. Para el periodo 1997-2001 la tasa cruda de mortalidad para varones fue de 1,2/100.000 personas por año, y para las mujeres 0,8/100.000 personas por año. La tasa de mortalidad aumentó gradualmente, llegando para el período 2000-2004 a 1,3 defunciones/100.000 personas por año, alrededor de 500 muertes/año (Latorre C., Loria F. 2011). Es decir la mortalidad por MCH en la población Argentina aumentó gradualmente de 1985 a 2009 con una tasa de 2,3% por año en los varones, y 2,4% por año en las mujeres (Loria, González, and Latorre 2010).

La agresividad de este tumor y el aumento de su incidencia en la población mundial, han hecho del MCH un objetivo prioritario en los programas de prevención y salud pública de muchos países.

2.1.3. Progresión del melanoma cutáneo humano

El modelo de la progresión del MCH describe los cambios histológicos que tienen lugar desde el melanocito normal hasta llegar al melanoma primario y por último el melanoma metastásico (Miller and Mihm 2006). Lo primero que ocurre es la proliferación de melanocitos que llevan al desarrollo de un **nevo benigno**. El segundo evento es la proliferación de melanocitos displásicos, que puede ocurrir a partir de un nevo benigno o en un lugar nuevo, y constituye un **nevo displásico**. El nevo displásico puede ser un precursor del MCH y tiene mayores chances de devenir en MCH. El **melanoma primario** se caracteriza por ser asimétrico, presentar distintos colores y bordes irregulares. La primera fase es la de **crecimiento radial**, donde las células anormales adquieren la capacidad de proliferar en la epidermis y en la interfase dérmico-epidérmica. Luego, se produce la fase de **crecimiento vertical**, donde las células adquieren la capacidad de ser metastásicamente competentes, invaden la dermis e incluso pueden llegar a la grasa subcutánea (Chudnovsky et al. 2005). Finalmente, se alcanza la etapa de **melanoma metastásico** cuando las células se dispersan a otras áreas de la piel y otros órganos, donde pueden proliferar y establecer focos metastásicos (Miller and Mihm 2006) (Figura 2.1).

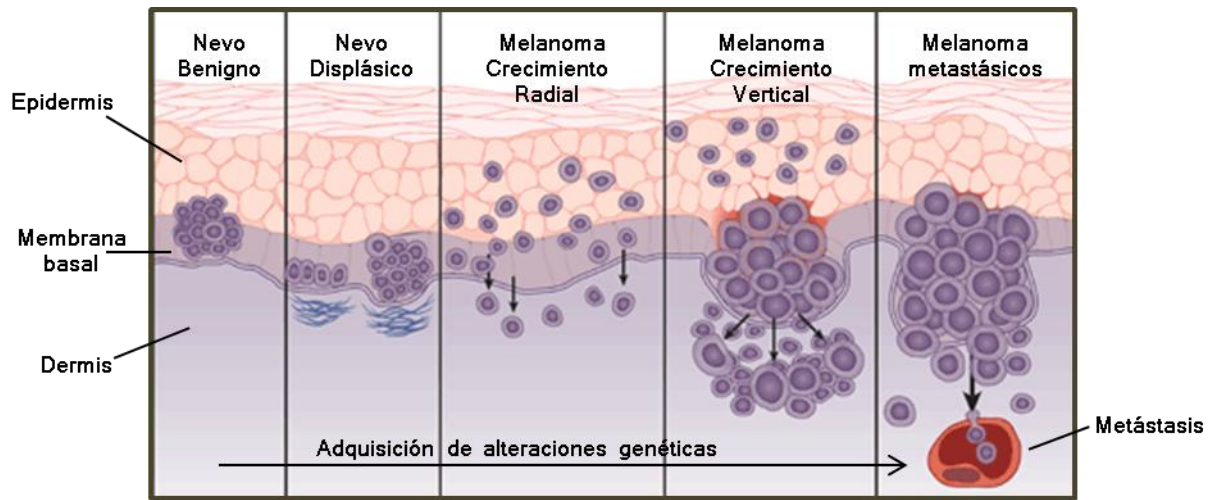


Figura 2.1. **Modelo de progresión del MCH.** Descripción de la localización y características de las distintas etapas de la progresión del MCH. Figura adaptada de Miller and Mihm, 2006.

El desarrollo del MCH es precedido por la ocurrencia de diferentes alteraciones genéticas. Puede generarse a partir de nevos benignos, congénitos o adquiridos a lo largo de la vida. (Duman et al. 2015). Las mutaciones en NRAS son frecuentes en nevos congénitos, mientras que mutaciones en BRAF están presentes en nevos adquiridos (Ichii-Nakato et al. 2006; Kinsler et al. 2013). Sin embargo, estos nevos rara vez progresan hacia melanoma, sino que pueden permanecer estáticos por décadas. Deben ocurrir progresivamente lesiones moleculares adicionales, como la activación de MITF, TERT, CDK4 y/o CCND1, la inactivación de TP53, CDKN2A y/o PTEN, que lleven a la transformación maligna (Dankort et al. 2009; Patton et al. 2005; Shain et al. 2015).

2.1.4. Clasificación del melanoma cutáneo humano

Existen distintos modelos de clasificación del melanoma, que describen el nivel de penetración en la dermis:

El modelo de Clark se basa en cuán profundo el MCH ha penetrado en las capas de la piel y establece 5 niveles. El nivel 1 es el melanoma *in situ*, confinado en la epidermis. El nivel 2 indica que las células malignas se encuentran en la capa directamente inferior a la epidermis, la dermis papilar. El nivel 3 refiere a cuando las células de MCH se encuentran entre la dermis papilar y la dermis reticular. El nivel 4 describe cuando las células

de MCH han penetrado en la dermis reticular o profunda. Por último, el nivel 5 indica que el MCH ya ha alcanzado la grasa subcutánea.

La clasificación de Breslow tiene en cuenta la profundidad del tumor, la cual se determina como el espesor en milímetros entre el estrato lúcido de la epidermis, o la base de la ulceración cuando existe, y la zona más profunda de la lesión donde se encuentran las células malignas.

Actualmente, la clasificación más aceptada para establecer en cuál de las distintas etapas se encuentra un tumor de MCH es la clasificación TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Balch et al. 2009). Esta clasificación se basa en la combinación de tres factores: la profundidad del tumor (T), como se describe por el índice de Breslow (expresada en mm), el estado de los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis distantes (M). La combinación de estos factores establece 5 estadios y 10 sub-estadios. El estadio 0 melanoma *in situ*, designa cuando las células anormales se encuentran confinadas en la epidermis. En el estadio I no hay evidencia de diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos o sitios distantes, y puede dividirse en dos subclases: IA e IB. En el estadio IA el espesor del tumor es menor a 1 mm, no hay ulceración, y se detecta menos de una mitosis por mm². En el estadio IB el tumor tiene un espesor menor o igual a 1 mm, hay ulceración o se detecta una o más mitosis por mm² o el espesor del tumor primario es de entre 1.01 – 2 mm sin ulceración. El estadio II se divide en 3 subestadios: IIA, IIB y IIC, ninguno de ellos presenta evidencia de diseminación a ganglios linfáticos o sitios distantes. En el estadio IIA el espesor del tumor primario es de entre 1.01 – 2 mm y está ulcerado o mide entre 2.01 – 4 mm y no está ulcerado. En el estadio IIB el tumor mide entre 2.01 – 4 mm y está ulcerado o mide más de 4mm y no está ulcerado. En el estadio IIC el tumor tiene un espesor mayor a 4 mm y está ulcerado. El estadio III abarca los casos donde se observa diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos regionales pero no hay evidencia de metástasis a sitios distantes. En el estadio IV el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como pulmón, hígado, cerebro, hueso, tejidos blandos, tracto gastrointestinal, o incluso a sitios de la piel alejados del tumor primario (Balch et al. 2009).

2.2. ALTERACIONES GENÉTICAS FRECUENTES EN MELANOMA CUTÁNEO HUMANO

El MCH es una enfermedad compleja y heterogénea con múltiples vías de señalización implicadas en su patogénesis a nivel molecular. Los avances en las técnicas genómicas producidos durante la última década han incrementado sustancialmente el conocimiento de los fenómenos moleculares que ocurren durante su génesis y desarrollo. Así como han permitido un mejor entendimiento del efecto de las mutaciones sobre la inmunidad antitumoral. Se ha visto que algunas alteraciones genéticas tienen un impacto sobre el microambiente tumoral, favoreciendo la evasión y en última instancia influenciando la respuesta a las inmunoterapias (Szczepaniak Sloane et al. 2017).

Resultados obtenidos de la secuenciación exómica de distintos tumores han revelado que el MCH alberga la tasa de mutaciones más alta entre todos los tipos de cáncer, con más 10 mutaciones/ mb en promedio (Lawrence et al. 2013) (Figura 2.2). Otros estudios genómicos han observado tasas mutacionales aún más altas, hasta 49,9 mutaciones/ mb (Hayward et al. 2017; Nikolaev et al. 2011; Watson et al. 2015). La alta tasa mutacional del MCH está asociada al daño inducido en el ADN por la luz UV, el principal factor de riesgo para esta enfermedad. La radiación UV induce dos tipos de lesiones en el ADN: los dímeros de pirimidina tipo cilobutano, y los fotoproductos 6-4 (Figura 2.3). Los dímeros de pirimidinas son considerados más carcinogénicos porque se generan con más frecuencia y son reparados de manera menos eficiente. Ambas lesiones se forman exclusivamente en pirimidinas adyacentes (C o T) y pueden generar mutaciones del tipo C>T o CC>TT, que representan el *hallmark* del daño al ADN inducido por la luz UV (Jhappan et al. 2003). En la Figura 2.2 se observa que la mayor proporción de mutaciones en el MCH son sustituciones de este tipo.

El desarrollo del MCH es precedido por la ocurrencia de diferentes alteraciones genéticas; con mayor frecuencia después de la exposición intermitente al sol y en personas con quemaduras solares frecuentes. Observaciones epidemiológicas sugieren que las exposiciones crónicas o de bajo grado a la radiación UV inducen protección contra el daño del ADN, mientras que las exposiciones intensas e intermitentes causan daño genético (Miller and Mihm 2006).

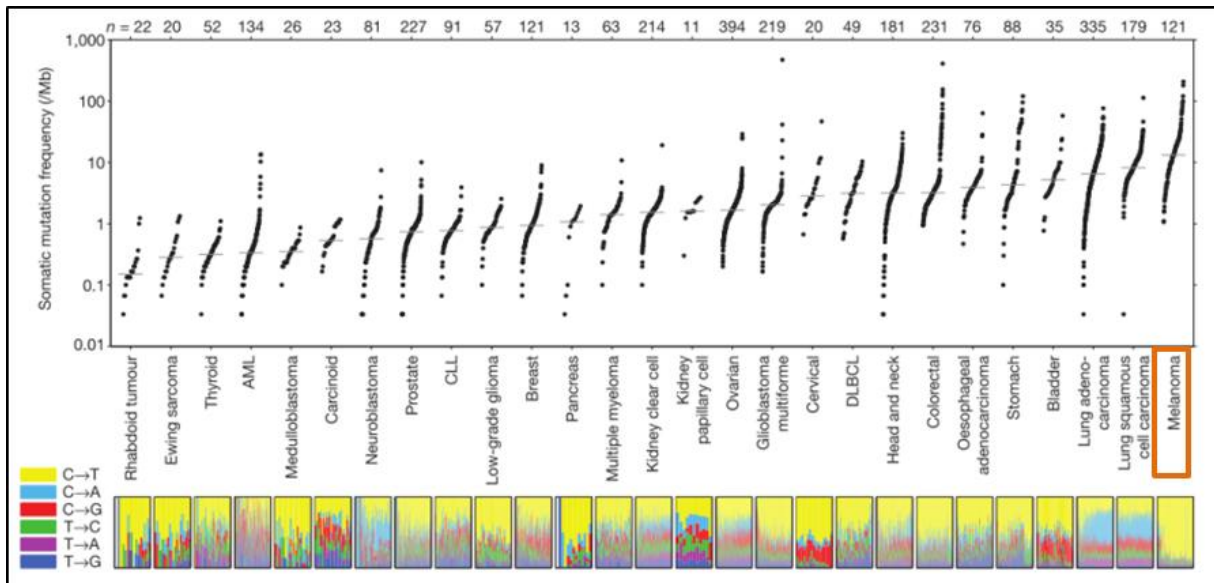


Figura 2.2. **Frecuencia de mutaciones somáticas observadas en exones a lo largo de los distintos tipos de tumores.** En el panel de abajo se muestra la proporción relativa de las seis sustituciones posibles. En MCH ocurren principalmente sustituciones C>T (Lawrence et al. 2013).

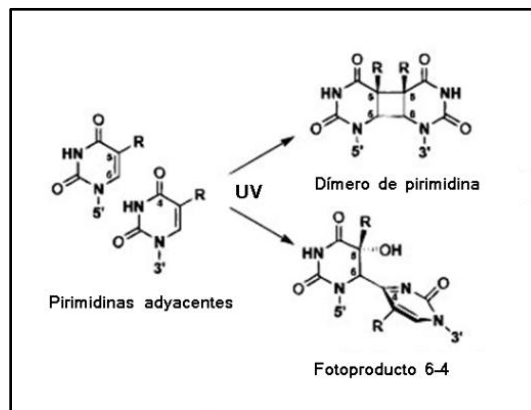


Figura 2.3. **Daño inducido al ADN por la luz UV.** La radiación UV induce dos tipos de daños en el ADN, dímeros de pirimidinas y fotoproductos 6-4, que pueden causar mutaciones C>T o CC>TT.

2.2.1. Vía de proliferación- Vía MAPK

La vía de señalización MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) está involucrada en muchos procesos celulares importantes tales como proliferación, supervivencia y

diferenciación (Reddy, Miller, and Tsao 2017) (Figura 2.4). Los componentes principales son las GTPasa Ras y las quinasas Raf, Mek y Erk¹. En ~90% de los casos de MCH esta vía se encuentra constitutivamente activa favoreciendo procesos oncogénicos (Hayward et al. 2017; Watson et al. 2015).

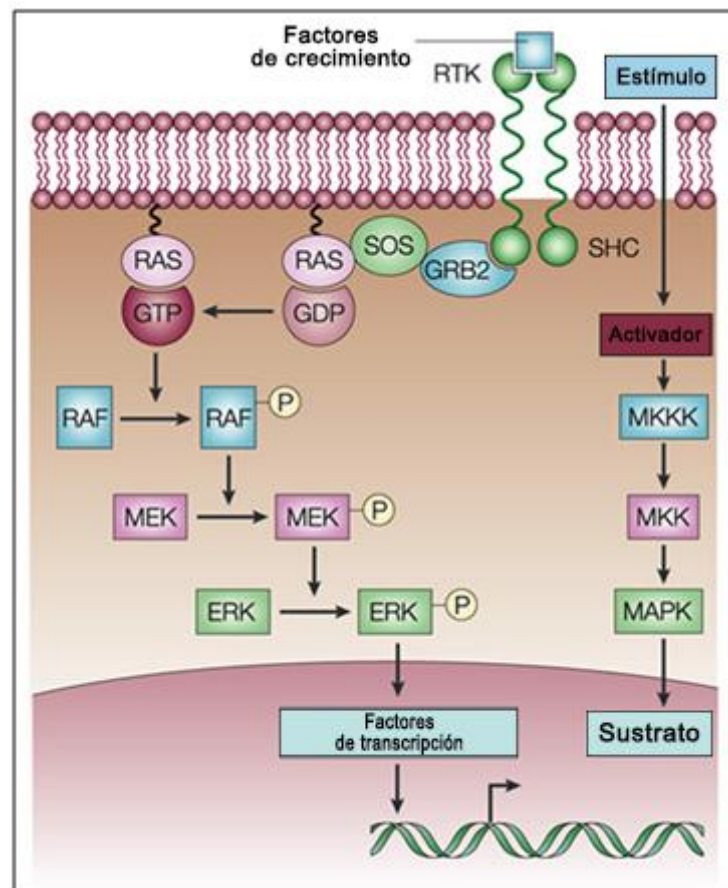


Figura 2.4. Vía MAPK. Es una cascada de transducción de señales que incluye a la GTPasa Ras y las quinasas Raf, Mek y Erk, implicada en muchos procesos celulares importantes que incluyen desde la diferenciación hasta la apoptosis. Imagen adaptada de Chin 2003.

Esta vía es activada por una enorme cantidad de estímulos, a través de receptos de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) o receptores tirosinas quinasas (RTKs), entre otros. Por ejemplo, en respuesta a la unión del factor de crecimiento epidérmico a su RTK, este dimeriza y se autofosforila en residuos tirosina. Esta autofosforilación recluta y activa

¹Observación: Los genes se escribirán en mayúscula (ej.: BRAF) y sus productos proteicos en minúscula (ej.: Raf).

enzimas, adaptadores, y proteínas “puente”, que catalizan el paso de Ras inactiva unida a guanosina-difosfato (Ras-GDP), a una forma activa unida a guanosina-trifosfato (Ras-GTP). Ras-GTP, interacciona con la familia de proteínas Raf, que constituyen el nivel MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa). Su activación se consigue mediante varios mecanismos, entre los que se cuentan la unión a Ras-GTP, la interacción con la membrana celular, y la fosforilación. Cuando Raf se activa, fosforila y activa a Mek, siguiente nivel de señalización (MAP2KK). Mek fosforila y activa a Erk (el nivel MAPK). Erk activado puede quedarse en el citosol o translocar al núcleo y ejercer su acción sobre diferentes sustratos relacionados con el crecimiento celular, mediante fosforilación o interacción directa con otras proteínas (de Arriba Muñoz and Berrocoso Martínez 2014; Mozuraitiene et al. 2015).

El principal gen alterado de esta vía es BRAF (uno de los genes que codifica la quinasa Raf), en el ~60% de los casos de MCH, y en el ~20% de los casos se observan mutaciones en NRAS (uno de los genes que codifica la GTPasa Ras). Además, en un pequeño número de casos se observan mutaciones en HRAS y KRAS, otros genes que codifican proteínas de la familia Ras (Hayward et al. 2017); y en los genes MAPK1 y MAPK2, que codifican para la quinasas Mek1/Mek2 (MEK) (Nikolaev et al. 2011). También se pueden ver amplificaciones de BRAF en ~20% de los casos de MCH (Watson et al. 2015).

2.2.1.1. Mutaciones en BRAF

El gen BRAF (oncogén v-raf sarcoma murino viral homólogo B), ubicado en el cromosoma 7, codifica para una serina/treonina quinasa, perteneciente a la familia Raf. Esta familia se compone de tres isoformas, codificadas por A-RAF, B-RAF y C-RAF. Todas las proteínas Raf comparten como sustrato a Mek1/2, en la vía MAPK (Lemech, Infante, and Arkenau 2012).

BRAF se identificó como un oncogén prevalente en MCH en el año 2002 (Davies et al. 2002) y desde entonces ha sido objeto de estudio como blanco para el desarrollo de terapias dirigidas. El 40 a 70% de los casos de MCH poseen alguna mutación puntual en este gen (Hayward et al. 2017; Watson et al. 2015). Las mutaciones más frecuentes son las que ocurren en la posición V600 del exón 15, siendo la sustitución de valina por glutamato (V600E) la más abundante, ~80% de las mutaciones en BRAF. También pueden ocurrir las sustituciones de valina por lisina, V600K, o por arginina, V600R, ~15% y ~2,5% de las mutaciones en BRAF respectivamente. Con menor frecuencia pueden encontrarse mutaciones

en la lisina 601 (K601), ~10% de las mutaciones en BRAF (Figura 2.5) (Siroy et al. 2015; Watson et al. 2015). Estas mutaciones generan un cambio de conformación en el segmento de activación de proteína que aumenta la actividad catalítica de Raf entre 200 a 400 veces en comparación a la proteína *wild type*, que resulta en la fosforilación continua de Mek y Erk, favoreciendo procesos oncogénicos (Davies et al. 2002).

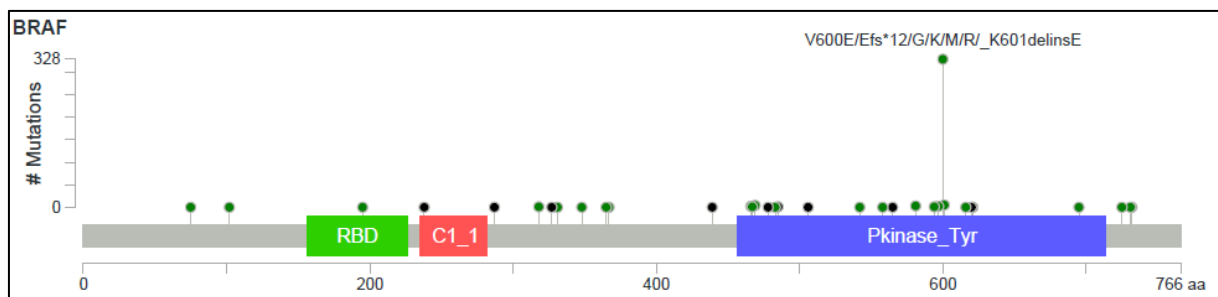


Figura 2.5. **Mutaciones en BRAF.** Esquema de la proteína, los puntos verdes indican las posiciones donde se han encontrado mutaciones *missense*, y los negros *nonsense*; la altura de las líneas es proporcional a la frecuencia de la mutación. Los rectángulos de colores indican los dominios de la proteína, los *hot spots* mutacionales se hallan en el segmento de activación del dominio catalítico (Cerami et al. 2012a; Gao et al. 2013).

Se ha propuesto que la señalización oncogénica de BRAF en MCH lleva a un fenotipo inmunosupresor caracterizado por la presencia de citoquinas inhibitorias tales como IL-1, IL-6, IL-10 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Khalili et al. 2012; Sumimoto et al. 2006). Así como también por la presencia de células inmunes supresoras, tales como células T regulatorias, células supresoras mieloides y macrófagos asociados a tumor, que inhiben la función de linfocitos T que infiltran el tumor (Mandalà et al. 2017).

Tumores con mutaciones en BRAF se encuentran típicamente en pacientes jóvenes, con exposición intermite al sol (Shain et al. 2015), y se han asociado con ulceración del tumor primario y una mayor capacidad para generar metástasis. La presencia de mutaciones en este oncogén correlaciona con una mayor carga de metástasis a distancia principalmente en pacientes estadio III (Barbour et al. 2014; Picard et al. 2014).

Mutaciones en BRAF también se observan en 80% de nevos benignos, sin embargo los nevos se mantienen en un estado de crecimiento arrestado y raramente progresan. Esto se explica porque la mutación de BRAF en los melanocitos normales produce

senescencia inducida por oncogén, la cual se evidencia por arresto del ciclo celular, inducción del inhibidor de ciclo celular p16 y actividad de β -galactosidasa, un marcador de senescencia (Michaloglou et al. 2005). Por lo tanto, aunque la alteración en BRAF es temprana, otras alteraciones genéticas son necesarias para evadir la senescencia y permitir el desarrollo del MCH (Shain et al. 2015).

2.2.1.2. Mutaciones en NRAS

El gen NRAS (Neuroblastoma viral oncogén homólogo Ras (v-ras)) se encuentra en el cromosoma 1 y codifica para una proteína G monomérica, clave en la regulación del crecimiento celular normal y la transformación maligna. Las proteínas de la familia Ras comprenden tres isoformas, codificadas por los genes de alta homología H-RAS, K-RAS y N-RAS (Yu, O’Toole, and Trent 2015). Las mutaciones en NRAS, se encuentran en el 20 al 35% de los casos de MCH, mientras que las mutaciones en KRAS y HRAS, son extremadamente raras, se observan en ~1% de los casos de MCH (Siroy et al. 2015; Watson et al. 2014). Las mutaciones más frecuentes en NRAS, ocurren en las glicinas 12 y 13 (G12 y G13) del exón 2, y la glutamina 61 (Q61) del exón 3, las cuales representan el ~15% y el ~85% de las mutaciones ocurridas en NRAS respectivamente (Siroy et al. 2015) (Figura 2.6).

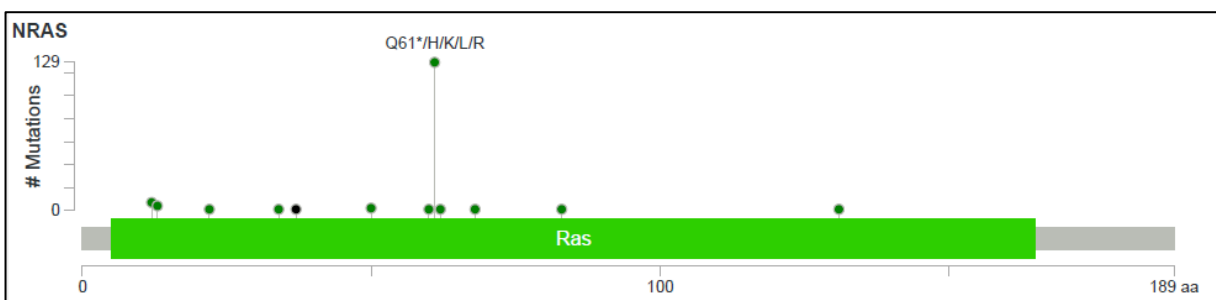


Figura 2.6. **Mutaciones en NRAS.** Esquema de la proteína, los puntos verdes indican la posición donde se han encontrado mutaciones *missense* y los negros *nonsense*, la altura de las líneas es proporcional a la frecuencia de la mutación. El rectángulo verde indica el dominio RAS, conservado en las GTPasas (Cerami et al. 2012a; Gao et al. 2013).

Las GTPasas Ras funcionan como interruptores canónicos, se unen a los efectores en su forma Ras-GTP y activan vías de señalización, como MAPK y PI3K-ATK que influyen en la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia (Burd et al. 2014). El

retorno de Ras a un estado inactivo, Ras-GDP, está catalizado por proteínas activadoras de GTPasa (GAP), que estimulan la actividad GTPasa débil e intrínseca de estas proteínas. Las mutaciones G12 y G13 hacen que las proteínas Ras sean insensibles a la actividad GAP, dando como resultado señalización oncogénica constitutiva (Adari et al. 1988). De forma similar, la mutación en Q61, un residuo requerido para una hidrólisis eficiente de GTP, impide el retorno de Ras a un estado inactivo Ras-GDP (Frech et al. 1994).

Las mutaciones en NRAS se identifican típicamente en pacientes mayores, con exposición crónica al sol (Shain et al. 2015). Son tumores de alta agresividad asociados con un aumento del grosor del tumor primario (alto índice de Breslow), alta tasa de mitosis y baja incidencia de ulceración (Reddy, Miller, and Tsao 2017). Generalmente ocurren de manera mutuamente excluyen con las mutaciones en BRAF y PTEN (Miller and Mihm 2006; Siroy et al. 2015; Watson et al. 2015). Dos estudios independientes mostraron que los pacientes con tumores con mutaciones en NRAS parecen tener una mejor respuesta a la inmunoterapia, que los pacientes con tumores con mutaciones en BRAF o aquellos con tumores BRAF y NRAS WT (Johnson et al. 2015; Joseph et al. 2012). El mecanismo que lleva a que estos pacientes tengan una mejor respuesta aún no se conoce, pero podría deberse en parte al ambiente inmunosupresor generado por BRAF^{V600E} y la pérdida de función (LoF) de PTEN, dado que las mutaciones en NRAS son generalmente mutuamente excluyentes con ambas alteraciones (Joseph et al. 2012)

Mutaciones en NRAS, son comunes en nevos melanocíticos congénitos (Kinsler et al. 2013), y al igual que las mutaciones en BRAF no son suficientes para lograr la transformación maligna por si solas (Miller and Mihm 2006).

2.2.2. Vías de proliferación- Vía PI3K-AKT

La vía de señalización PI3K-AKT es crucial en numerosos aspectos como el crecimiento y la supervivencia celular, y se encuentra alterada en ~60% de los casos de MCH (Hayward et al. 2017). Esta vía es activada por numerosos estímulos fisiológicos a través de receptores RTKs y GPCRs, o través de la GTPasa Ras. En respuesta a la estimulación, se produce la activación de la Pi3k (fosfatidilinositol-3quinasa). La cual una vez activada puede asociarse con los lípidos de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifostato (PIP2) y catalizar su transformación en fosfatidilinositol 3-4,5-trifostato (PIP3). El PIP3 generado por la Pi3k, es un

segundo mensajero importante en muchos procesos celulares y el principal mediador de la actividad de la Pi3k.

El PIP3 lidera la activación de la quinasa Akt a través de la quinasa Pdk1, un efector clave de esta vía. La señalización por Akt inactiva varios factores proapoptóticos como BAD y factores de transcripción FKHR (*Forkhead*), así como otros factores de transcripción que incrementan la expresión de genes antiapoptóticos, como CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMP-cíclico), NF-κB e HIF-1α (Martini et al. 2014). Akt también activa la serina/treonina quinasa mTOR (blanco en mamíferos de rapamicina), que regula la traducción proteica, en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento, al fosforilar distintos componentes de la maquinaria de la síntesis de proteínas (Pinzón, Serrano, and Sanabria 2009) (Figura 2.7).

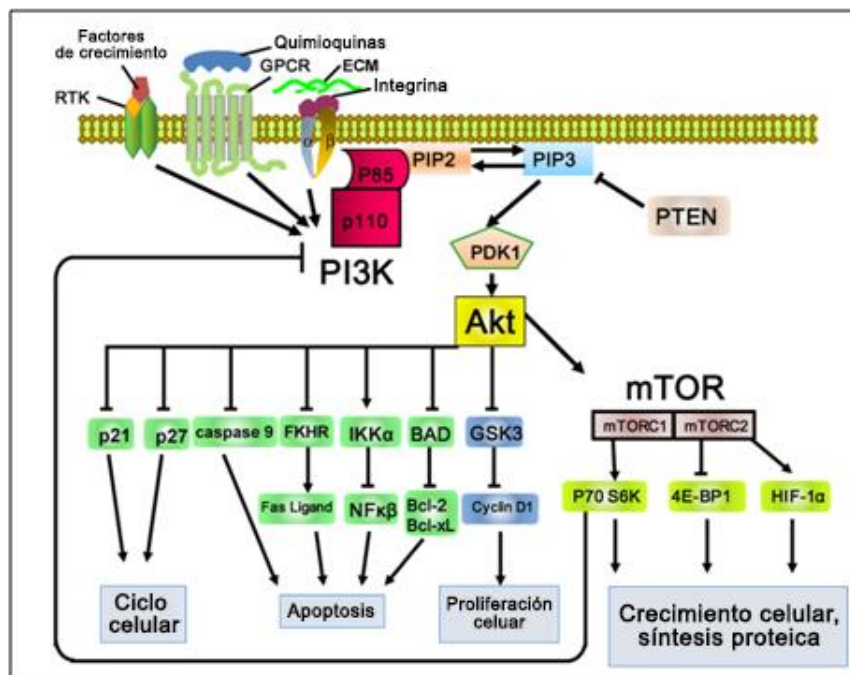


Figura 2.7. **Vía PI3K-AKT.** La Pi3k, puede ser activa por receptores celulares o por la GTPasa Ras, y es regulada negativamente por Pten. La señalización continua aguas abajo a través de Akt, que tiene múltiples *targets*, impide la apoptosis y promueve el crecimiento celular.

Distintos factores intercambiados de nucleótidos de guanina (GEFs) específicos de la GTPasa Rac han sido identificados como efectores de la vía PI3K. Los GEFs

P-Rex y Vav requieren PIP3 para catalizar el paso de Rac-GDP a Rac-GTP, que induce procesos de adhesión, migración y progresión del ciclo celular (Martini et al. 2014).

Esta vía de señalización es regulada negativamente por Pten, una fosfatasa que remueve los fosfatos que la Pi3k agrega al PIP2, frenando la señalización aguas abajo. El gen PTEN se encuentra deletado en muchos tipos de cáncer, promoviendo la activación continua de la vía. Este estado permite que una célula aún en malas condiciones, resista a la apoptosis, sobreviva y prolifere, contribuyendo a la inestabilidad cromosómica, y procesos carcinogénicos. Además, RAC1 puede estar mutado en ~8% de los MCH y NRAS en el ~20% (como ya se mencionó). Mutaciones en los genes AKT3 (uno de los genes que codifica Akt), PI3KCA (que codifica para Pi3k) y mTOR ocurren en un número menor de casos. En ~20% de los casos puede verse sobreexpresión de AKT3 (Figura 2.7) (Watson et al. 2015).

2.2.2.1. Mutaciones en PTEN

El gen supresor de tumor PTEN (homólogo de fosfatasa y *tensina*), ubicado en el cromosoma 10, codifica una fosfatasa de especificidad doble (que puede desfosforilar tanto lípidos como proteínas), cuyo sustrato mejor descrito es el PIP3. Desempeña un papel crítico en la modulación de funciones celulares, como la proliferación, el crecimiento, la supervivencia y el metabolismo. Es un regulador negativo de la vía PI3K-AKT, que actúa como un contra balance de la acción de la Pi3k, que fosforila el PIP2. Por lo que su función supresora de tumor se le adjudica dado su actividad fosfatasa lipídica.

La LoF de PTEN se puede dar tanto por mutaciones inactivantes como por delección del gen. Las mutaciones se encuentran en el 8 al 16% de los casos de MCH (Cerami et al. 2012a; Hayward et al. 2017) y pueden darse a lo largo del todo el gen con excepción del exón 9. Sin embargo, dos de tres mutaciones halladas se observan en exón 5, por lo que conforma un *hot spot* mutacional (Figura 2.8). Este exón codifica parte del dominio fosfatasa, que junto con el dominio de unión a la membrana (C2), son esenciales para la función supresora de tumor de PTEN (Aguissa-Touré and Li 2012). La pérdida de PTEN por delección se da en el 15 al 20% de casos de MCH (Cerami et al. 2012a; Hayward et al. 2017) y puede abarcar parte del gen o el gen completo, así como la pérdida del cromosoma 10 (Aguissa-Touré and Li 2012) (Figura 2.8). Las alteraciones en PTEN, ocurren con frecuencia en tumores BRAF^{V600E}, pero por lo general son mutuamente excluyentes con las mutaciones en NRAS (Goel et al. 2006).

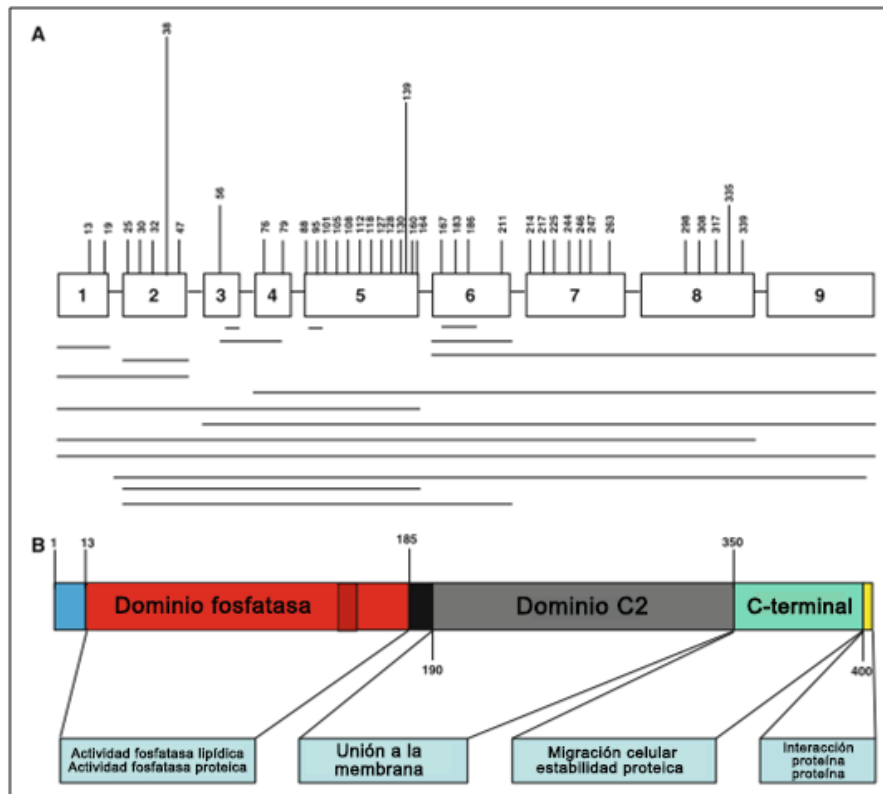


Figura 2.8. **Representación esquemática de PTEN y de las mutaciones halladas en MCH.**

A. Estructura del gen PTEN. Cada rectángulo indica un exón, las líneas verticales indican la posición donde pueden ocurrir mutaciones y la altura de la línea la frecuencia con la que se ve. Las líneas horizontales representan donde pueden darse las deleciones. El exón 5 representa un *hot spot* mutacional. B. Representación esquemática de los dominios y función biológica de fosfatasa Pten. Los dominios se representan con diferentes colores. Los dominios fosfatasa (rojo) y de unión a la membrana C2, (gris) con claves para la función supresora de tumor. Otros dominios importantes son el dominio C-terminal (verde) involucrado en la estabilidad de la proteína y el dominio PDZ, necesario para la interacción proteína-proteína (Aguissa-Touré and Li 2012).

Según Shain *et al.* la deleción homocigota de PTEN, parece ser un evento tardío en la progresión del MCH, ya que únicamente se observó en melanoma invasivo (Shain et al. 2015). Sin embargo, distintos estudios *in vivo*, han visto que menores niveles de PTEN correlacionan con mayor susceptibilidad a desarrollar tumores, lo cual sugiere que niveles de PTEN por debajo de los normales son insuficientes para llevar a cabo su actividad supresora

de tumor (Alimonti et al. 2010; Shen-Li et al. 2010). Además la LoF de PTEN podría tener un papel importante en la generación de metástasis. En un modelo murino, donde generaron nevos benignos BRAF^{V600E}, al silenciar PTEN no solo se observó la progresión de melanoma, sino la aparición de metástasis en ganglios y pulmón con un corto período de latencia (Dankort et al. 2009).

La LoF de PTEN, se asocia con un fenotipo inmunosupresor caracterizado por un aumento en la expresión de citoquinas inmunosupresoras como IL-6, IL-10, VEGF y la reducción de la función de linfocitos T citotóxicos tanto *in vitro*, como *in vivo*. En pacientes la LoF de PTEN correlaciona con una menor presencia de infiltrado inmune, así como mala evolución ante el con tratamiento con TILs (linfocitos infiltrantes de tumor) y terapias anti-PD-1, en comparación con los pacientes PTEN^{WT}. Todo esto junto sugiere que la LoF de PTEN induce inmuno resistencia, por la señalización constante de la vía PI3K-AKT (Dong et al. 2013; Peng et al. 2016).

2.2.2.2. Mutaciones en RAC1

El gen RAC1 (Ras relacionados con sustrato de toxina botulínica C3 1), ubicado en el cromosoma 7, codifica una RHO GTPasa monomérica, que juega un papel clave en la organización y motilidad del citoesqueleto celular. Las proteínas Rac inducen la formación de protrusiones (lamellipodios) y replegamientos (*rufflings*) en la membrana (Ridley 2001). A través de la regulación de la de polimerización de actina, cumplen un rol esencial en el mantenimiento de la morfología celular y la migración celular. Además, influencia la proliferación, y la transcripción de distintos genes (Vu et al. 2015).

Estudios de secuenciación exómica recientes han identificado la mutación recurrente RAC1^{P29S} (sustitución de prolina por serina en la posición 29), en el 5 al 9% de los casos de MCH (Figura 2.9). Esta mutación es causada por una transición C>T, asociada al daño por exposición a la radiación UV (Hodis et al. 2012; Krauthammer et al. 2012).

Estudios estructurales han demostrado que la región del *switch* I de RAC1, que contiene la alteración P29S, es un elemento regulador conservado crucial de la superfamilia GTPasa y es importante para la unión de los nucleótidos y para las interacciones con moléculas efectoras. P29S, provoca un cambio de conformación que reduce la actividad GTPasa de Rac en un 50%, resultando en su activación constitutiva (Krauthammer et al. 2012) (Figura 2.10). Esto clasifica a RAC^{P29S}, como una mutación oncogénica, siendo la

tercera mutación activante más frecuente en MCH luego de BRAF^{V600E} y NRAS^{Q61}. A diferencia de estas dos mutaciones, la RAC1^{P29S} no se encuentra en nevos (Halaban 2015), pero se ha visto la misma frecuencia mutacional tanto en tumores primarios como en metástasis, lo que sería consistente con que tuviera un rol en la tumorigénesis temprana (Krauthammer et al. 2012).

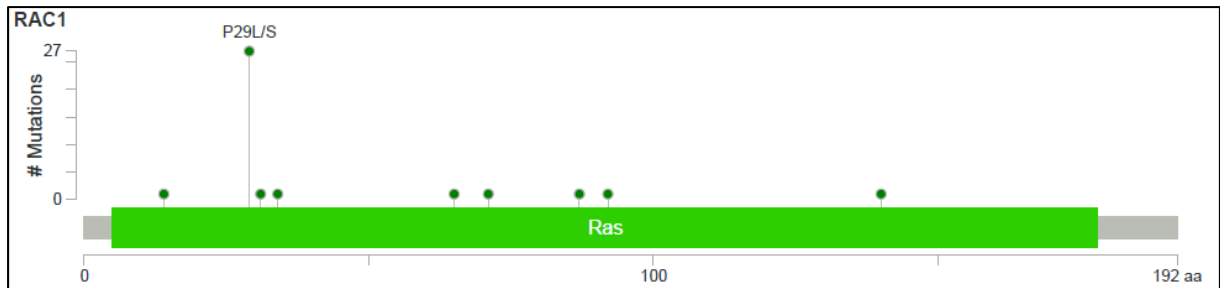


Figura 2.9. **Mutación recurrente RAC^{P29S}**. Esquema de la proteína, los puntos verdes indican la posición donde se han encontrado mutaciones, la altura de las líneas es proporcional a la frecuencia de la mutación. El rectángulo verde indica el dominio RAS, conservado en las GTPasas (Cerami et al. 2012a; Gao et al. 2013).

Se ha visto que tumores RAC1^{P29S} tienen mayor índice de Breslow, mayor índice mitótico y suelen estar ulcerados con más frecuencia que los RAC^{WT} (Mar et al. 2014). Además, RAC1^{P29S} ocurre principalmente en tumores NRAS y BRAF WT (Krauthammer et al. 2012).

Vu *et al.*, reportaron que líneas celulares de MHC con la mutación RAC^{P29S} presentan una mayor expresión de PD-L1, con respecto a células RAC^{WT}. También se observó una expresión significativamente mayor de PD-L1 en pacientes que tenían la mutación RAC1^{P29S} en comparación con muestras de MCH RAC^{WT}. Estos hallazgos respaldan la posibilidad de que la mutación RAC1^{P29S} pueda impulsar la progresión tumoral a través de supresión de la respuesta inmune antitumoral (Vu et al. 2015). Además, la expresión de RAC1^{P29S} incrementa la fosforilación de Erk (Krauthammer et al. 2012) y confiere resistencia a los inhibidores de Raf (Watson et al. 2014).

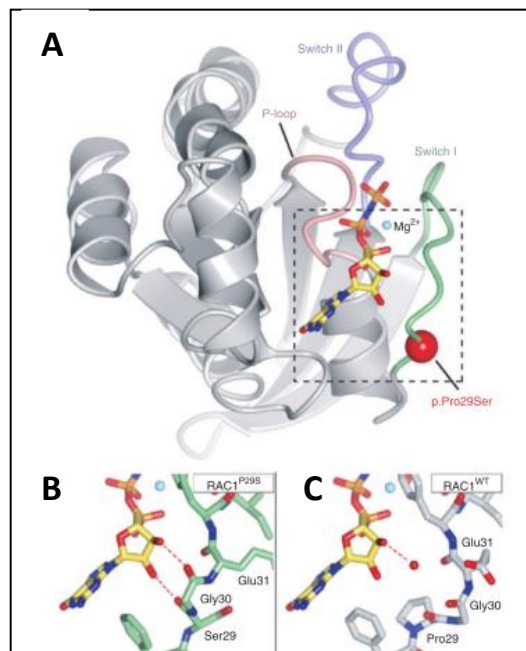


Figura 2.10. **Estructura de RAC1^{P29S} cristalizada.** A. Esquema general de RAC1^{P29S}, muestra el bucle P (rosa), el *switch I* (verde), el *switch II* (violeta), Mg²⁺ (celeste) y el análogo de GTP de hidrolización lenta, GMP-PNP (formato de barra). La esfera roja indica la ubicación de P29S. B. Vista de primer plano del *switch I* en RAC1^{P29S} unido a GMP-PNP. C. Vista de primer plano del *switch I* en RAC1^{WT} unido a GMP-PNP. Se observa el cambio de conformación que introduce la mutación de la estructura de la proteína (Krauthammer et al. 2012).

2.2.3. Vías de estabilidad genómica, inmortalidad y ciclo celular

El ciclo celular es un proceso estrictamente ordenado y regulado, que implica la convergencia de distintas vías de señalización, así como mecanismos de regulación positivos y negativos. En particular, la fase temprana del *check point* G1-S (que decide el compromiso de la célula con la replicación del ADN durante la fase S), está regulada por p16^{INK4}, Rb (Retinoblastoma) y el complejo Cdk4/6-D1(ciclinas D1 asociadas con las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6, Cdk4 y Cdk6) (Chin 2003). El complejo Cdk4/6-D1 impulsa el ciclo celular mediante la fosforilación de Rb, al impedir su interacción inhibitoria con el factor de transcripción E2F, que promueve la transcripción de genes relacionados con el avance de la fase G1 a S. p16^{INK4} es un inhibidor del complejo Cdk4/6-D1, que mantiene a Rb en un estado hipofosforilado arrojando la célula en fase G1, cuando la célula no está en condiciones de replicarse (Figura 2.11) (Kannengiesser et al. 2009).

Alteraciones en los genes implicados en este proceso, que llevan a una mayor progresión del ciclo celular se observan en el 40% de los casos de MCH (Hayward et al. 2017). CDKN2A, codifica p16^{INK4} y es el gen supresor de tumores más involucrado en la patogénesis y predisposición al MCH. Se encuentra inactivado por mutaciones o deleciones en ~ 45% de los casos de MCH (Hayward et al. 2017; Watson et al. 2015). Mutaciones en este gen y en menor medida CDK4, pueden encontrarse en línea germinal predisponiendo al desarrollo de la enfermedad (Kannengiesser et al. 2009). Además, en un número menor de casos también pueden encontrar distintas alteraciones en los genes RB y CCNC1, que codifica la ciclina D1 (Hayward et al. 2017).

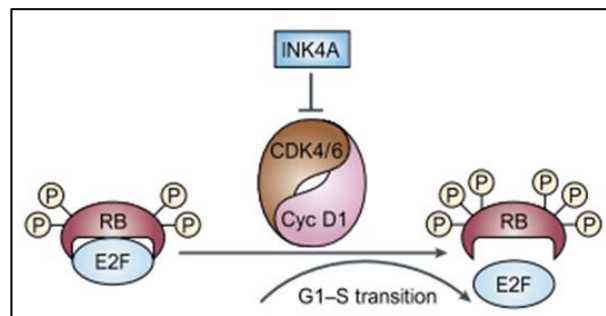


Figura 2.11. **Regulación del *check point* G1-S.** El complejo Cdk4/6-D1, induce la entrada en fase S al inactivar Rb por fosforilación y permitir la liberación del factor de transcripción E2F. p16^{INK4} inhibe el complejo Cdk4/6-D1 arrojando la célula en fase G₁ (Chin 2003).

En respuesta al daño en el ADN se inicia una cascada de señalización a partir de las quinasas Atm y Atr, que implica la fosforilación y activación del factor de transcripción p53. p53 normalmente se encuentra secuestrado por Mdm2, una ubiquitina ligasa que promueve su degradación impidiendo que interactúe con sus genes *target*. A la vez p14^{ARF} secuestra a Mdm2, permitiendo su estabilización y acumulación. Por tanto p53 puede activar la transcripción de genes que frenen la progresión del ciclo celular o que promuevan la apoptosis. Entre sus dianas se encuentra el gen CDKN1A, que codifica a p21, un inhibidor de la progresión del ciclo celular (Figura 2.12) y genes que codifican proteínas proapoptóticas como Noxa, Puma y Bax (Miller and Mihm 2006; Mozuraitiene et al. 2015).

Las alteraciones en alguno de los miembros de esta vía de señalización se encuentran en el ~ 40% de los casos MCH y generan aumento de la inestabilidad genómica, así como disminución de la apoptosis (Hayward et al. 2017). TP53 es el gen supresor de

tumores más mutado a lo largo de todos los tipos de cáncer y se asocia con varios síndromes de cáncer hereditario. En MCH, se encuentran tanto mutaciones como delección en TP53, pero en menor medida que en otros tipos de cáncer. Amplificación de MDM2 y mutaciones en los genes ATM, CHEK1/2 (codifican quinasas que se encuentran aguas arriba en la vía de señalización), y mutaciones en CDKN2A, que afecten p14^{ARF}, se observan en un pequeño número de casos (Hayward et al. 2017).

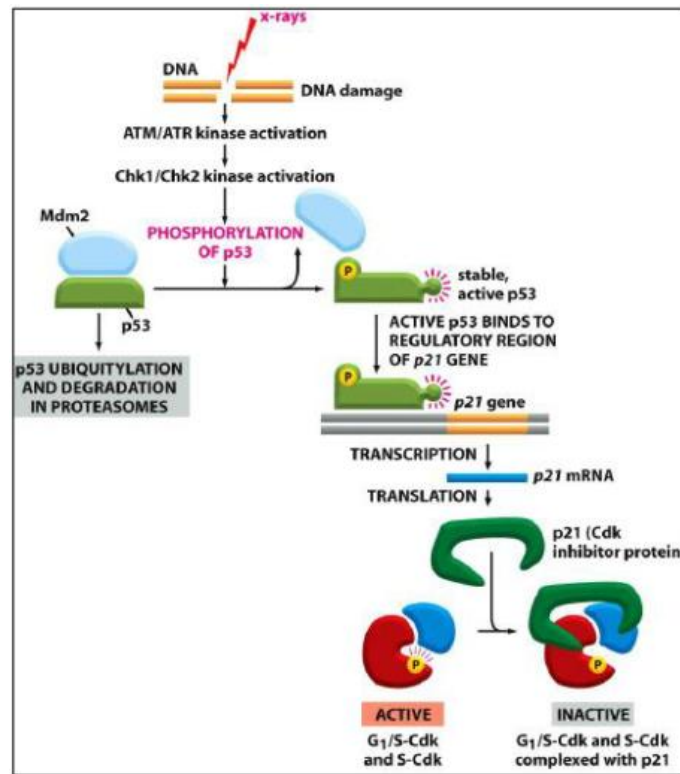


Figura 2.12. **Vía p53.** En respuesta al daño al ADN, p53 promueve la transcripción de genes que permiten el arresto del ciclo celular o la apoptosis, dependiendo de las condiciones y el tipo de celular.

Los telómeros son una pieza clave en la estabilidad y protección de los extremos del cromosoma. El mantenimiento de su longitud está a cargo de la telomerasa (aunque también se han encontrado mecanismos independientes alternativos), que se encuentra activa únicamente durante la embriogénesis. En células somáticas su actividad esta reprimida por distintos mecanismos regulatorios dependientes de tejido (Arvelo and Morales 2004). El acortamiento progresivo de los telómeros con cada división celular es una

característica normal del envejecimiento, y puede acelerarse por la exposición a riesgos ambientales nocivos como la radiación UV (Read, Wadt, and Hayward 2016).

Recientemente se han descubierto mutaciones recurrentes en el promotor de TERT (gen que codifica la telomerasa) a lo largo de diferentes tipos de cáncer (Fredriksson et al. 2014; Ma et al. 2014; Zheng et al. 2014). Por lo que, la regulación alterada de los telómeros podría contribuir al potencial replicativo ilimitado de las células cancerosas. El ~75% de los casos de MCH tiene alguna alteración en TERT, principalmente mutaciones en el promotor, pero también pueden encontrarse amplificaciones y mutaciones del gen (Hayward et al. 2017; Watson et al. 2015).

2.2.3.1. Mutaciones en TP53

El gen supresor de tumor TP53, ubicado en el cromosoma 17, codifica para el factor de transcripción p53, una fosfoproteína nuclear tetramérica en su forma funcional, que desempeña un papel clave en la respuesta al daño en el ADN, la regulación del ciclo celular y la apoptosis. TP53 está mutado en el 50% de todos los cánceres y en 12 al 22% de los casos de MCH (Hayward et al. 2017; Siroy et al. 2015), e interviene tanto en la iniciación como en la progresión tumoral (Yu, O'Toole, and Trent 2015). Las mutaciones se encuentran principalmente en los exones 5, 6, 7 y 8, que codifican el dominio de unión al ADN. Generalmente interrumpen la habilidad de p53 para unirse a sus secuencias *target* y cumplir su rol supresor de tumor (Stengel et al. 2014) (Figura 2.13).

Distintos estudios de secuenciación exómica de MCH han visto que TP53 posee el mayor número de mutaciones C>T o CC>TT UV-inducidas (Hodis et al. 2012; Siroy et al. 2015; Watson et al. 2015). Viros *et al.* utilizaron un modelo donde se induce la expresión de BRAF^{V600E} en melanocitos murinos. Un grupo de ratones es expuesto reiteradamente a radiación UV, otro grupo a radiación UV con protector solar factor 50, y un tercer grupo no fue expuesto a la radiación UV. Mutaciones en TP53 fueron halladas en 6 de 15 melanomas expuestos a UV, mientras que en sólo 1 de 11 melanomas expuesto a UV con protector solar, y en ninguno de los tumores no expuestos. Estos datos respalda el rol de la radiación UV en la inducción de mutaciones en TP53 en melanoma (Viros et al. 2014).

Se ha visto que las mutaciones en este gen son significativamente más frecuentes en tumores primarios ubicados en la cabeza o cuello, en comparación con que en

aquellos del tronco o las extremidades (Siroy et al. 2015). Además, estas mutaciones ocurren en tumores con BRAF o NRAS mutado (Siroy et al. 2015; Watson et al. 2015). Un estudio realizado en Zebrafish observó que la expresión específica de BRAF^{V600E} en melanocitos causa la proliferación ectópica de estos, pero no progresan. Sin embargo, los peces TP53^{-/-} en los que se expresó BRAF^{V600E} en los melanocitos, además de inducirse la formación de “nevus”, desarrollaron melanoma maligno (Patton et al. 2005). Viros *et al.* demostraron que la mutación inducible en los melanocitos murinos no es suficiente para el desarrollo del melanoma. Sin embargo, ratones con las mutaciones TP53^{R172H} y BRAF^{V600E} en su melanocitos, si desarrollan la enfermedad (Viros et al. 2014). Con lo cual, la inactivación de TP53, podría ser una de las alteraciones que contribuya a superar la senescencia inducida por oncogenes, y tenga un rol clave en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, según Shain *et al.*, la alteración de TP53 es un evento tardío en la progresión del MCH, ya que se encontraron únicamente en melanoma invasivo (Shain et al. 2015).

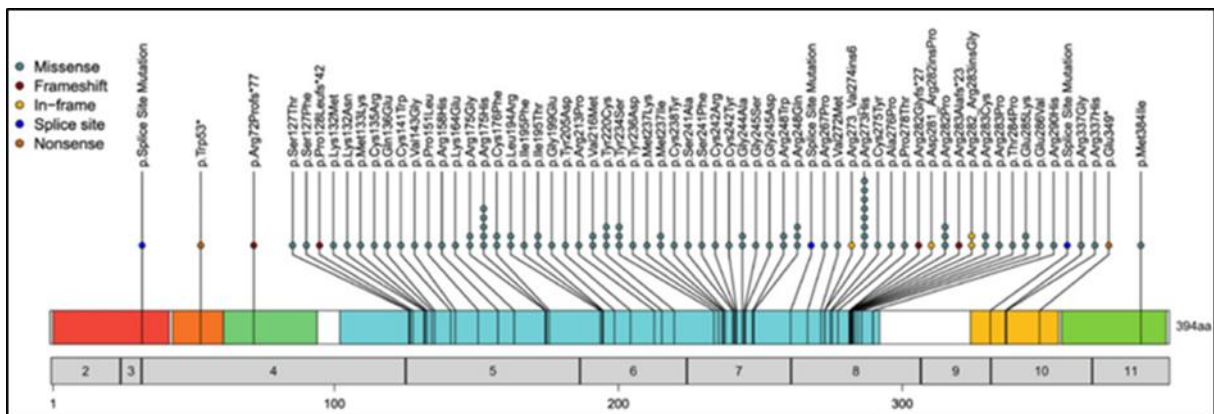


Figura 2.13. **Esquema de p53.** Los rectángulos grises inferiores indican los exones y los rectángulos de colores los distintos dominios proteicos. El dominio de unión al ADN es el celeste, donde se observan la mayor parte de las mutaciones, representadas con líneas que indican el codón. El dominio de tetramerización se indica en amarillo, en rojo y naranja los dominios de transactivación 1 y 2 respectivamente (Stengel et al. 2014).

2.2.3.2. Mutaciones en CDKN2A

El gen supresor de tumor CDKN2A (inhibidor de la ciclina dependiente de quinasa 2A), ubicado en el cromosoma 10, tiene una organización genómica inusual. Utilizando marcos de lectura distintos, codifica dos proteínas con actividad supresora de

tumor, no relacionadas estructuralmente. La proteína $p16^{INK4A}$ se sintetiza mediante la incorporación de los exón 1 α , 2 y 3 del gen, mientras que la proteína $p14^{ARF}$ (ARF: *alternative reading frame*) se produce por el *splicing* alternativo del exón 1 β con los exones 2 y 3 (Figura 2.14).

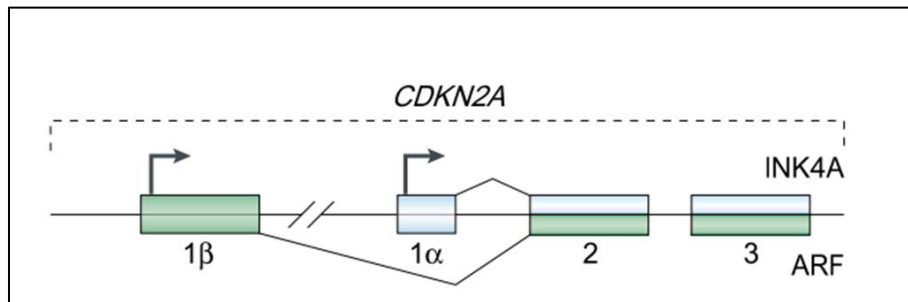


Figura 2.14. **Esquema de la estructura del gen CDKN2A.** Los exones se representan con rectángulos verdes o celestes. $p16^{INK4A}$ es codificada a partir de los exones 1 α , 2 y 3. $p14^{ARF}$ es a partir *splicing* alternativo del exón 1 β (se encuentra 20 kb aguas arriba del exón 1 α) con los exones 2 y 3, en un marco de lectura diferente (Chin 2003).

$p16^{INK4A}$ impide la entrada en fase S de células con daño en el ADN, actividad de oncogenes, o señales de estrés. Es un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina de la familia INK4A, que interactúa a partir de su dominio ANK conservado con las Cdk4 y Cdk6 inhibiendo su unión a la ciclina D1, manteniendo Rb hipofosforilado. La ausencia de $p16^{INK4A}$ permite una mayor actividad del ciclo celular.

$p14^{ARF}$ funciona como supresor de tumor arretando el ciclo celular o promoviendo la apoptosis en respuesta al daño al ADN o estímulos aberrantes de crecimiento. Induce la estabilización y acumulación de p53, secuestrando a su regulador negativo Mdm2. En ausencia de $p14^{ARF}$ disminuyen los niveles de p53, y la respuesta al daño al ADN queda inconclusa (Miller and Mihm 2006).

CDKN2A es el gen supresor de tumor más implicado en el desarrollo y la predisposición al MCH. La alteración más común es la delección del gen, que implican la pérdida de $p16^{INK4A}$ y $p14^{ARF}$; y se encuentra en ~45% de los casos de MCH (Cerami et al. 2012a; Hayward et al. 2017). Mutaciones de CDKN2A en línea germinal se registran en 20 a 40% de los casos familiares (Aguilera et al. 2015; Goldstein et al. 2006), y en 12 a 20% de los casos esporádicos de MCH (Cerami et al. 2012a; Hayward et al. 2017; Watson et al. 2015).

Las mutaciones se encuentran generalmente en los exones 1α y 2, (Monzon et al. 1998) y pueden afectar la secuencia tanto de p16^{INK4A} como p14^{ARF}. Aunque en la práctica las mutaciones afectan principalmente la función de p16^{INK4A} (Figura 2.15) y tiene un efecto neutro o casi imperceptible en la función de p14^{ARF} (Kannengiesser et al. 2009).

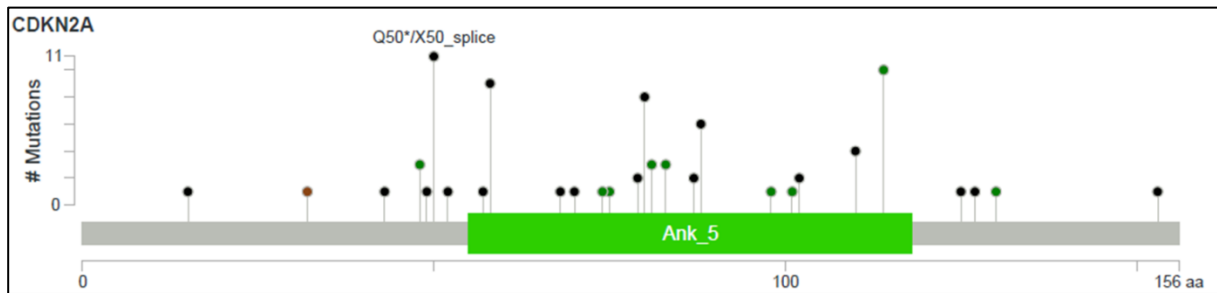


Figura 2.15. **Mutaciones en p16^{INK4A}**. Esquema de la proteína, los puntos indican las posiciones donde se han encontrado mutaciones; *missense* verde y *nonsense* en negro. La altura de las líneas es proporcional a la frecuencia de la mutación. Se encuentran principalmente el dominio ANK conservado en la familia de inhibidores INK4A (representado por el rectángulo verde), esencial para la interacción de Cdk4 y Cdk6 (Cerami et al. 2012a; Gao et al. 2013).

La pérdida de función (LoF) de CDKN2A, ya sea por mutaciones o deleciones, es frecuente en tumores con NRAS o BRAF mutado (Watson et al. 2015). Se ha visto que los ratones con p16^{INK4A} delecionado son propensos al desarrollo del MCH, pero requieren la adquisición de mutaciones adicionales en genes como HRAS, que activen vías de proliferación, para la transformación maligna (Chin et al. 1997). Los animales con deficiencia de p14^{ARF} desarrollan melanoma con un corto periodo de latencia luego de la exposición a luz UV. Además, en cultivo *in vitro* la deficiencia de p14^{ARF} permite superar la senescencia inducida por oncogenes (Sharpless et al. 2004). Estos datos demuestran la implicancia de la LoF de CDKN2A, en el desarrollo del MCH. Aunque según Shain *et al.*, la deleción de CDKN2A sería un evento tardío en el progreso de la enfermedad, ya que solo se vio en melanoma invasivo (Shain et al. 2015).

2.2.3.3. Mutaciones en el promotor de TERT

El gen TERT, ubicado en el cromosoma 5, codifica la subunidad proteica de la holoenzima telomerasa, esencial para la replicación de la terminación de los cromosomas. Mantiene el largo de los telómeros adicionando la secuencia repetitiva 5` TTAGGG 3` en sus extremos. Consiste en un componente proteico, con actividad retrotranscriptasa, (codificado por TERT) y un componente ribonucleico, que sirve como templado para la adición de las secuencias repetitivas. Se encuentra activa únicamente en células progenitoras, y en células somáticas normales su expresión se encuentra reprimida o en muy bajos niveles (Arvelo and Morales 2004).

Recientemente se descubrió que 40 a 80% de los casos de MCH contienen alguna mutación en el promotor de TERT (Heidenreich et al. 2014; Horn et al. 2013; Huang et al. 2013; Watson et al. 2015). Las dos mutaciones más frecuentes son C-146T y C-124T, las cuales ocurren de modo mutuamente excluyente. Además se identificaron las mutaciones recurrentes A-57C y CC-138_-139TT. Todas crean *de novo* la secuencia consenso 5'-CCCCTTCGGG-3', para la unión de factores de transcripción de la familia *E-twenty-six ternaty complex factor* (Ets-TCF) (Fredriksson et al. 2014; Horn et al. 2013; Huang et al. 2013) (Figura 2.16). Estos nuevos sitios de unión para Ets-TCF, provocan un aumento significativo de la expresión del mRNA de TERT con respecto al promotor WT, tanto *in vitro* (Huang et al. 2013), como en pacientes (Heidenreich et al. 2014).

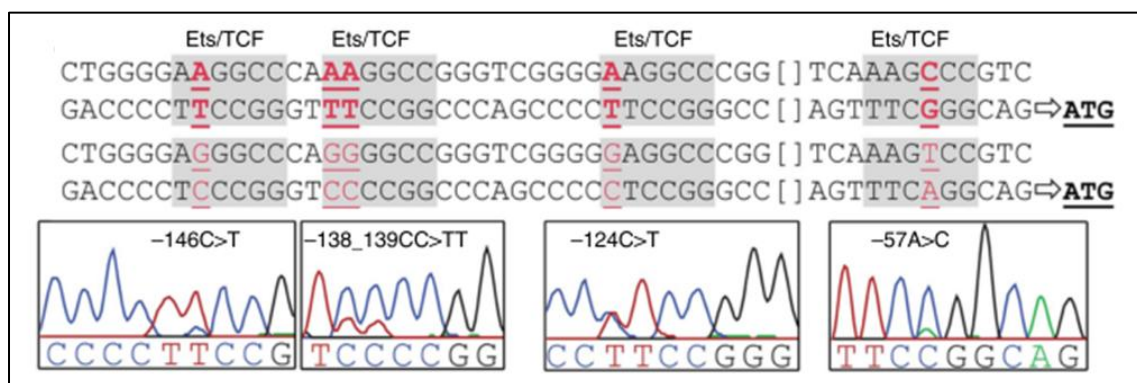


Figura 2.16. **Representación de las mutaciones recurrentes en el promotor de TERT en MCH.** En la parte superior se muestra la secuencia WT y la secuencia alterada que crea los nuevos sitios de unión para los factores de trascrición de la familia Ets-TCF. Abajo se muestran los cromatogramas de las cuatro mutaciones más frecuentes (Heidenreich et al. 2014).

Las mutaciones en el promotor de TERT se han encontrado con mayor frecuencia que las mutaciones en BRAF y NRAS incluso en lesiones intermedias y melanoma *in situ*. Lo cual sugiere que son un evento genético temprano en el desarrollo del MCH y podría ser un mecanismo que contribuya a superar la senescencia celular inducida por oncogenes, favoreciendo que las células adquieran mutaciones oncogénicas subsecuentes (Huang et al. 2013; Shain et al. 2015). En un modelo murino de melanoma se demostró que la supresión de la actividad de la telomerasa reduce significativamente la invasión tumoral y el potencial metastásico (Bagheri et al. 2006). Sin embargo, en un estudio reciente se vio una asociación modesta entre la reducción del largo de los telómeros y los promotores más activos (Hayward et al. 2017). Por lo que el papel de las mutaciones en el promotor de TERT en el desarrollo del MCH aún es incierto.

Heidenreich *et al.* encontraron asociación significativa entre los marcadores de mal pronóstico de MCH, ulceración y alto índice de Breslow, y las mutaciones en el promotor de TERT. A su vez, la frecuencia de metástasis regionales y a distancia también fue mayor en los pacientes con el promotor mutado (Heidenreich et al. 2014).

2.2.4. Clasificación genómica del melanoma

El consorcio The Cancer Genome Atlas (TCGA), realizó un análisis integral (genómico, transcriptómico y proteómico) de 333 tumores de MCH, primarios o metastásicos; el mayor análisis hasta el momento (Watson et al. 2015). En base a los resultados obtenidos propusieron la clasificación genómica que se explica a continuación:

Subtipo BRAF

El subtipo genómico más grande está formado por tumores con mutaciones en los *hot spots* mutacionales del exón 15 de BRAF, V600 y V601. En este caso estas mutaciones se encontraron en el 52% de los casos y la más frecuente fue V600E. Se vio que estas mutaciones ocurren de manera mutuamente excluyente con las mutaciones en los *hot spots* mutacionales en N/H/K-RAS. Además, los principales genes de otras vías de señalización alterados en este subtipo fueron: el promotor de TERT, CDKN2A, PTEN y en un menor número de casos TP53, ARID2, y PPP6C. Los pacientes de este subtipo fueron significativamente más jóvenes que en los otros subtipos (Watson et al. 2015).

Subtipo RAS

El segundo mayor subtipo se define por la presencia de mutaciones en los *hot spot* mutacionales, G12, G13 y Q61, de los genes de la familia Ras (N/H/K-RAS). En este caso este subtipo comprendió el 28% de los casos y las mutaciones se vieron principalmente en NRAS, solo en siete casos se vieron mutaciones en HRAS o KRAS. Todas fueron mutuamente excluyentes con las mutaciones en los *hot spot* mutacionales de BRAF. En este subtipo también se encontraron alteraciones en CDKN2A, mutaciones en el promotor de TERT, sobreexpresión de AKT3, amplificación de CCD1 y en menor medida se vieron mutaciones en TP53, PPP6C y ARID2 (Watson et al. 2015).

Subtipo NF1

Este subtipo se define por la presencia de mutaciones en el gen NF1 (*Neurofibromatosis type 1*). NF1, codifica la proteína Neurofibromina de 2818 aac. y múltiples dominios. Es una proteína GAP y que actúa como regular negativo de Ras, por lo tanto su falta de actividad desregula la vía de las MAPK (Philpott et al. 2017). Las mutaciones en NF1, se pueden encontrar a lo largo de sus 61 exones, y la gran mayoría genera LoF. En este estudio el subtipo NF1, representó el 14% de los casos y tuvo una tasa mutacional dos veces mayor que los otros tres subtipos. Las mutaciones en NF1, ocurrieron de un modo excluyente con las mutaciones en los *hot spots* de BRAF. En este subtipo también se vieron mutaciones en el promotor de TERT, TP53 y ARID2, así como distinto tipo de alteraciones en CDKN2A y sobreexpresión de ATK3. Los pacientes de este subtipo fueron significativamente mayores que en los otros tres subtipos (Watson et al. 2015).

Subtipo Triple WT

Este subtipo se define como un grupo heterogéneo caracterizado por la falta de mutaciones en los *hot spots* mutacionales de BRAF y N/K/H-RAS o mutaciones en NF1. En este grupo se encontraron diversas mutaciones que afectan la vía MAPK, como en los receptores KIT, VEGFR, PDGFR. En otras vías de señalización se encontraron alteraciones en CDKN2A, amplificación de TERT y MDM2, y sobreexpresión de AKT3. Solo ~30% de las muestras de este grupo presentó el *hallmark* del daño inducido por luz UV, en comparación con los otros subtipos donde se encontró en ~90% de los casos. En contraste, en

este grupo se vio la mayor cantidad de rearrreglos estructurales y variación del número de copias (Watson et al. 2015).

2.3. TRATAMIENTO DEL MELANOMA CUTÁNEO HUMANO

Los pacientes en los que el MCH es diagnosticado de forma temprana (Estadios 0 y IA) pueden ser curados por extirpación quirúrgica del tumor primario. Una vez que el melanoma ha invadido la dermis con mayor profundidad, o si el tumor está ulcerado, el pronóstico se torna más desfavorable. La sobrevida a 10 años disminuye del 93% en pacientes estadio IA, al 39% para pacientes en estadio IIC, aunque en ninguno de estos estadios haya evidencias de diseminación a ganglios linfáticos o sitios distantes (Balch et al. 2009). Esto muestra el gran potencial invasivo de las células de MCH.

Los pacientes estadios IIB, IIC y III tienen alto riesgo de metástasis a distancia aún no detectables, por lo que en estos casos se administran tratamientos con el fin de evitar la recurrencia del MHC. En el estadio III, donde las células tumorales han metastatizado a ganglios linfáticos regionales, la sobrevida a 5 años varía del 70 % en el estadio III temprano al 39% en el estadio IIIC avanzado (Balch et al. 2009).

El MHC es resistente a las terapias convencionales, no responde a terapias como la quimioterapia sin blancos específicos, como la dacarbazina, o combinaciones con cisplatino, vinblastina y carmustina (Atkins et al. 2008). Sin embargo, es el tumor inmunogénico por excelencia. Se caracteriza por expresar múltiples antígenos (Ags) que pueden ser reconocidos por el sistema inmune y generar una respuesta específica. Entre estos se encuentran los Ags de diferenciación melanocítica (MDA), proteínas que están asociadas a las membranas de los melanosomas e involucradas en la producción de melanina, que son expresados tanto por melanocitos normales como por células de melanoma. Entre los MDA se encuentran los Ags MART-1, gp100, tirosinasa, *tyrosinase-related protein* (Trp) -1 y Trp-2 (Maio 2012).

El tratamiento aprobado actualmente para los pacientes con estadios IIB, IIC y III de MCH es la administración de interferón alfa-2b (INF- α 2b) en altas dosis, un potenciador del sistema inmune. Si bien este tratamiento aumenta la sobrevida libre de enfermedad (por sus siglas en inglés DFS), se ha visto que el incremento en la sobrevida total (por sus siglas en inglés OS) es muy modesto o nulo (Algazi, Soon, and Daud 2010;

Eggermont et al. 2012); y se acompaña de una gran toxicidad, que lleva a la interrupción del tratamiento en un alto número de casos (Algazi et al. 2010; Kirkwood et al. 2002). Por ejemplo, los resultados a largo plazo del estudio Trial EORTC 18991 fase III, donde 1256 pacientes se randomizaron a recibir INF- α 2b pegilado versus observación, no mostraron un incremento significativo en cuanto a la sobrevida libre de metástasis a distancia (por sus siglas en inglés DMFS) o la OS. Si bien cierto beneficio fue visto en los pacientes con tumores ulcerados. Además, en el 37% de los pacientes el tratamiento tuvo que ser suspendido debido a la toxicidad (Eggermont et al. 2012). Por otro lado, la duración y dosis óptima de tratamiento aún no están definidas. Distintas dosis y esquemas de tratamiento con INF- α 2b se siguen ensayando actualmente para pacientes con MHC estadios IIB, IIC y III (Hauschild et al. 2010; Mohr et al. 2015; Payne et al. 2014).

Otros tratamientos se están evaluando para pacientes con alto riesgo de recurrencia de MCH post-cirugía. Por ejemplo, en la fase III de un estudio con ipilimumab (anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4), en pacientes estadio III, se vio un incremento significativo de la sobrevida a cinco años, la OS y la DMFS con respecto al placebo. Aunque acosta de una alta toxicidad, ya que en ~40% de los pacientes el tratamiento debió ser suspendido por esta causa (Eggermont et al. 2016).

En el estadio IV de la enfermedad, cuando ya se han detectado metástasis a sitios distantes del tumor primario, la sobrevida a un año varía entre el 33% y 62% dependiendo del grado de avance (Balch et al. 2009).

A pesar de que el MCH es resistente a la quimioterapia, hasta hace algunos años el tratamiento aprobado para el melanoma metastásico era la dacarbazina, agente alquilante que permitía obtener respuestas completas en solo 5-10% de los pacientes. Sin embargo, en los últimos cinco años se han aprobado nuevos tratamientos que han significado una revolución en el tratamiento del melanoma metastásico: las terapias dirigidas con inhibidores de la vía de las MAPK y la inmunoterapia con anticuerpos contra los checkpoints inmunes CTLA-4 y PD-1.

Se han desarrollado anticuerpos contra los checkpoints inmunes CTLA-4 y PD-1, que han sido aprobados para su uso en pacientes con melanoma metastásico llevando a un aumento de la sobrevida total (Robert, Long, et al.; Robert, Schachter, et al.).

Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) es una glicoproteína que presenta homología con CD28 y juega un papel clave en la regulación de la homeostasis inmune. La

expresión en superficie de CTLA-4 se induce en células T efectoras activadas y está constitutivamente expresada en linfocitos T regulatorios (Takahashi et al. 2000). CTLA-4 se une con mayor afinidad que CD28 a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 que se expresan en las células presentadoras de antígenos, limitando la activación de las células T. Se han desarrollado diferentes anticuerpos que hacen *target* en CTLA-4, entre ellos ipilimumab, cuyo uso está aprobado en pacientes con melanoma metastásico (Robert et al. 2011).

Programmed cell death protein 1 (PD-1), es un receptor inhibitorio de la familia de CD28 que tiene como ligandos a PD-L1 y PD-L2. Este receptor se expresa en la superficie de linfocitos T activados, y también en linfocitos B y monocitos. Su rol principal es limitar la actividad de las células T en los tejidos periféricos durante una respuesta inflamatoria (Ishida et al. 1992; Keir et al. 2006; Okazaki and Honjo 2007). La activación de las células T induce la expresión de PD-1 y la unión a su ligando PD-L1 lleva a la inhibición de la activación de la célula T. No se detecta expresión de PD-L1 en la mayoría de los tejidos normales pero se encuentra expresado en diferentes tumores humanos, incluido el melanoma (Zou and Chen 2008). Se han desarrollado distintos anticuerpos contra PD-1 como nivolumab y pembrolizumab, y otros anti-PD-L1. Estos anticuerpos también tuvieron resultados positivos en ensayos clínicos con pacientes (Robert, Long, et al. 2015; Robert, Schachter, et al. 2015).

Si bien estas terapias aumentan la sobrevida total de pacientes con melanoma metastásicos, solo el ~30% de los pacientes tiene una respuesta durable (Aris, Mordoh, and Barrio 2017; Management 2017). Lo cual se acompaña de una considerable toxicidad, principalmente en el caso de ipilimumab (Malkhasyan, Zakharia, and Milhem 2017).

Por otro lado, a partir del descubrimiento que las células de MHC presentan alto porcentaje de mutaciones en BRAF, se diseñaron inhibidores específicos para BRAF mutado, entre ellos vemurafenib. En un ensayo clínico de fase III, se observó un aumento en la sobrevida total y libre de progresión al tratar a los pacientes de melanoma metastásico con vemurafenib respecto a dacarbazina, y por tanto el tratamiento fue aprobado (Chapman et al. 2011). También se han desarrollado otros inhibidores de BRAF mutado, como dabrafenib, cuyo uso también está aprobado en la clínica (Hauschild et al. 2010).

Sin embargo, a pesar de las importantes respuestas observadas en los pacientes tratados con los inhibidores, la mayoría recae luego de algunos meses ya que se adquiere resistencia (Montagut et al. 2008; Nazarian et al. 2010; Paraiso et al. 2011; Shi et al. 2012).

Con el objetivo de evitar la resistencia, se han desarrollado inhibidores para MEK, la quinasa que se encuentra debajo de BRAF en la vía de la señalización de las MAPK. Entre los inhibidores de MEK desarrollados se encuentran trametinib, el cual fue aprobado en terapia combinada con dabrafenib (Robert, Karaszewska, et al. 2015), y cobimetinib (Larkin et al. 2014), el cual fue aprobado para el tratamiento en combinación con vemurafenib. Sin embargo, el tratamiento combinado con los inhibidores de BRAF y MEK también lleva al desarrollo de resistencia, si bien algo retrasada respecto a lo observado con monoterapia (Long et al. 2016).

2.3.1. Vacuna terapéutica CSF-470

Del escenario antes descrito surge que es importante la obtención de nuevos y mejores tratamientos que puedan administrarse en adjuvancia. Con el fin de prolongar la supervivencia y eventualmente curar a los pacientes que luego de la extirpación quirúrgica del tumor primario tienen riesgo de tener metástasis aun no detectables.

En nuestro laboratorio se desarrolló la vacuna terapéutica anti-MCH CSF-470, con el propósito de inducir una respuesta innata y adaptativa contra focos micrometastásicos de MCH y prevenir que progresen a metástasis. Dicha vacuna está compuesta por células letalmente irradiadas de cuatro líneas celulares alogénicas de MCH más Bacillus Calmette-Guerin (BCG) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante (rhGM-CSF). La base racional de la vacuna es la siguiente: las células de MCH irradiadas constituyen “mini-aloinjertos” que desencadenan una reacción de rechazo por parte del paciente receptor, a la vez que desafían al sistema inmune con Ags de melanoma. La BCG induce inflamación local y polariza las células inmunes hacia un perfil Th1, así como promueve la activación de células NK citotóxicas y de memoria. El rhGM-CSF es un potente atrayente de monocitos y es esencial para la diferenciación de monocitos en células dendríticas (DCs). Esta combinación facilita la captación de los Ags por DCs y macrófagos, y su posterior presentación a linfocitos T naïve. Potencialmente induciendo la expansión de linfocitos reactivos específicos que podrían eliminar las células tumorales. Además, se incrementa la respuesta innata contra el tumor, con lo que también son blanco las células tumorales HLA negativo. (Barrio et al. 2006; Madorsky Rowdo et al. 2015; Mordoh et al. 2017).

Recientemente finalizó la fase II del estudio clínico, donde CSF-470 fue ensayada versus INF- α 2b en dosis intermedias, en pacientes estadios IIB/IIC/III de MCH post-cirugía. Se trataron 31 pacientes, de los cuales n=20 fueron ramdonizados a la rama CSF-470 y n=11 a la rama INF- α 2b. Los pacientes tuvieron una media y máxima de seguimiento de 39,4 y 83 meses, respectivamente. La DMFS fue significativamente mayor para los pacientes asignados a la rama CSF-470 en comparación con los pacientes asignados a la rama INF- α 2b (p=0,022 test de Gehan-Breslow-Wilcoxon). La proporción de DMFS a 25 meses fue de 72,8% para la rama vacuna y 27,2% para la rama INF- α 2b. Sin embargo, cuando se tuvo en cuenta la progresión regional y a distancia (DFS), la diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0,12 test de Gehan-Breslow-Wilcoxon). La OS no pudo ser calculada en para los pacientes de la rama vacuna, porque aún no ocurrieron la cantidad de eventos suficientes, y fue de 39 meses para los pacientes en la rama INF- α 2b. En cuanto a la calidad de vida, fue significativamente mayor en los pacientes tratados con la vacuna que en los tratados con INF- α 2b (p<0,0001 test-t con corrección de Welch). Solo 2/11 pacientes pudieron terminar el tratamiento con INF- α 2b, debido a los efectos adversos; en cambio, 20/20 pacientes culminaron el tratamiento con la vacuna (Mordoh et al. 2017).

Hasta el presente CSF-470 ha tenido resultados superiores al INF- α 2b, tanto en lo que hace a sobrevida libre de progresión a distancia y calidad de vida. Próximamente será puesta en marcha la fase III del ensayo clínico.

3. *HIPÓTESIS*

Alteraciones genéticas frecuentes en MCH pueden generar un impacto en la velocidad de crecimiento del tumor, en el microambiente tumoral, y en la respuesta inmune. Considerados en conjunto, estos elementos pueden favorecer la evasión inmune y en última instancia afectar la respuesta al tratamiento con inmunoterapia (Frederick et al. 2013; Joseph et al. 2012; Liu et al. 2006; Peng et al. 2016; Sumimoto et al. 2006). **La hipótesis que se buscó contrastar en este estudio exploratorio es si existen diferencias en cuanto al perfil de alteraciones genéticas frecuentes entre los tumores de aquellos pacientes que responden al tratamiento con las inmunoterapias CSF-470 o interferón alfa-2b, y aquellos que no lo hacen.**

Se emplearon doce biopsias tumorales de pacientes, que se clasificaron en dos grupos dependiendo de la DMFS. Se evaluó un panel de siete genes elegidos por encontrarse frecuentemente alterados en MHC, y estar relacionados con la inmunomodulación del microambiente tumoral o con la evolución de la enfermedad. A partir del ADN obtenido de las biopsias, se estudiaron los genes de interés mediante NESTED-PCR, seguido de secuenciación por Sanger. Además, se analizó la variación del número de copias de algunos genes por FISH (Hibridación Fluorescente *in situ*). Posteriormente se comparó el perfil de alteraciones genéticas obtenido en cada grupo.

4. METODOLOGÍA

4.1. MUESTRAS DEL ESTUDIO

4.1.1. Biopsias tumorales

Se analizaron biopsias tumorales fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE) de pacientes con MCH estadio III, pertenecientes al protocolo CASVAC0401 (TABLA I). Se escogieron biopsias de pacientes que respondieron favorablemente al tratamiento y biopsias de pacientes que progresaron, de las cuales se contaba con suficiente disponibilidad de material para la extracción de ADN. El estudio se pudo completar en 12 pacientes.

Este ensayo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Alexander Fleming (CEIAF). Se realizó con muestras cuyos pacientes dieron su consentimiento informado, protegiendo sus datos personales.

TABLA I. Descripción de las biopsias del estudio.

Paciente	Sexo	Edad	Biopsia	Estadio	Tratamiento	DMFS ^{*‡} (meses)
003	M	42	Tumor primario	III	CSF-470	2
005	F	33	Mts. [†] cutánea	III	CSF-470	86+
009	F	45	Tumor primario	III	-	0
012	F	41	Mts. ganglio	III	INF- α 2b [¥]	9
021	F	51	Tumor primario	III	CSF-470	48+
022	M	46	Tumor primario	III	CSF-470	50+
024	F	29	Tumor primario	III	INF- α 2b	42+
025	F	61	Mts. cutánea	III	CSF-470	36+
028	F	53	Mts. ganglio	III	INF- α 2b	1
041	M	52	Mts. ganglio	III	CSF-470	10
042	M	44	Mts. ganglio	III	CSF-470	10
045	M	51	Mts. ganglio	III	CSF-470	18+

*DMFS= Sobrevida libre de metástasis a distancia; ‡ DMFS al 30/09/17; † Mts = metástasis; ¥ INF- α 2b= interferón alfa 2b.

4.1.2. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de MHC establecidas previamente a partir de biopsias de tumores en el Centro de Investigaciones Oncológicas, FUCA: MEL-XY2, MEL-XY3, MEL-XX4, MEL-XY9, MEL-XY11 y MEL-XX15. Además, se emplearon las líneas celulares de adenocarcinoma de colon DLD-1 y HT-29.

4.2. PROCEDIMIENTOS

4.2.1. Cultivo *in vitro* de líneas de MCH y adenocarcinoma de colon

Las células de MCH se mantuvieron en cultivo en Medio Melanoma (MM) con 10% suero fetal bovino (SFB) inactivado (Natocor). El MM está compuesto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Cat. 31600) y F-12 (Ham's Nutrient Mixture, Gibco, Cat. 21700) en relación 1:1; suplementado con: 3,7 g/l bicarbonato de sodio, 20 mM selenito de sodio, 100 µM ácido ascórbico, 0,3 mg/ml galactosa, 0,15 mg/ml piruvato de sodio, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 5 µg/ml insulina porcina y 2 mM L-glutamina.

Las células de adenocarcinoma de colon se cultivaron en medio DMEM/F-12 en relación 1:1, con 10% SFB inactivado, 100 UI/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina.

Las células se mantuvieron en estufa a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂. Para su crecimiento en cultivo se realizaron pasajes con diluciones desde 1/2 a 1/10, según la tasa de división de cada línea celular. Para levantarlas se extrajo todo el medio, luego se realizó un lavado con PBS y se incubó el tiempo necesario para que las células se despeguen en estufa a 37°C con EDTA (0,2 g/l EDTA, 8 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 0,06% NaHCO₃).

Para la obtención de pellets celulares para la extracción de ADN, se recolectaron aproximadamente 2-3x10⁶ células y se levantaron como se describió previamente. Luego se centrifugaron por 5 min a 300 g y se realizó un lavado con PBS. Los pellets se almacenaron en freezer de -80°C hasta su utilización.

Para la criopreservación de las células, se resuspendieron en medio de congelación (50% SFB, 40% DMEM y 10% de DMSO), en una concentración máxima de 1x10⁷ células por criotubo de 2 ml. Los criotubos se transportaron en hielo a un freezer de -80°C. Luego, se trasladaron a un tanque de nitrógeno líquido libre de micoplasma. La ausencia de micoplasma se controló por tinción con el colorante de Hoechst.

4.2.2. Extracción de ADN

4.2.2.1. Extracción de ADN de biopsias de MCH fijadas en FFPE

Obtención de la muestra:

Se realizaron 2 a 4 cortes de 4 μm de espesor por cada biopsia, o en el caso que hubiera, se utilizaron cortes en blanco en vidrio de carga positiva. En ambos casos el tejido se recuperó en un tubo eppenderdorf.

Previo a la extracción de ADN, se chequeó la presencia de tejido tumoral en las biopsias a analizar, observando al microscopio cortes teñidos con hematoxilina-eosina (H&E).

Protocolo de extracción de ADN:

Se empleó el Kit comercial *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Life-Technologies, Thermo Fisher Scientific™). Se utilizó el protocolo descrito a continuación:

Rehidratación del tejido: Se agregó 1 ml de Xilol y se homogenizó con *vortex*. Se incubó por 15 min a 50°C y se centrifugó por 2 min a 15.000 g. Se retiró el sobrenadante sin tocar el pellet y se repitió el procedimiento. Luego, se colocó 1 ml de etanol 100%, se homogenizó y centrifugó por 2 min a 15.000 g. Se repitió el mismo proceso utilizando sucesivamente etanol 95%, 75% y 50%. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se secó el pellet durante 30 min.

Digestión del tejido con proteinasa K: Se preparó la *master mix* de digestión. Se agregó 100 μl de Buffer de Digestión y 4 μl de Proteinasa K (kit) por cada muestra. Luego se colocó 104 μl de *master mix* a cada muestra y se incubó a 50°C durante 24 h - 48 h, según cada muestra.

Aislamiento del ADN: Se preparó la *master mix* de aislamiento. Por cada 100 μl de muestra se mezcló: 120 μl de Buffer Aditivo Aislamiento (kit) con 275 μl de etanol 100%. Se colocó la cantidad correspondiente de *master mix* a cada muestra. Después se pasó cada muestra (máximo 700 μl) a una columna con filtro, previamente rotulada. Se centrifugó a 15.000 g por 1 min. Se desechó el *flow-through*. En el caso de ser necesario se repitió este paso hasta pasar la totalidad de la mezcla por la columna.

Lavado: Se añadió a cada muestra 700 μl de Wash 1 (kit), se centrifugó a 15.000 g por 1 min y se desechó el *flow-through*. Se adicionó 500 μl de Wash 2/3 (kit) a cada muestra, se centrifugó a 15.000 g por 1 min y se descartó el *flow-through*. Se centrifugó a 15.000 g por 1 min para remover el líquido residual del filtro.

Digestión del tejido con RNasa: Se preparó la *master mix* para la digestión con RNasa. Por muestra se mezcló: 50 μl de agua destilada estéril apirógena (Roux) con 10 μl de

RNasa (kit). Luego se añadió 60 µl de la *master mix* de digestión RNasa a cada muestra y se incubó por 30 min a T° ambiente (T°_a).

Lavado: Se adicionó 700 µl de Wash 1 (kit) a cada muestra, se centrifugó a 15.000 g por 1 min y se desechó el *flow-through*. Luego se añadió 500 µl de Wash 2/3 (kit) a cada muestra, se centrifugó a 15.000 g por 1 min y se repitió este paso. Se volvió a centrifugar a 15.000 g por 1 min. Finalmente, se retiró la columna que contiene el filtro y se colocó en un nuevo Eppendorf de 1,5 ml previamente rotulado.

Elución: La elución se realizó en 60 µl de agua destilada estéril apirógena (Roux) precalentada a 90°C. Se centrifugó a 15.000 g por 1 min.

Rendimiento y pureza: Se midió la concentración de cada muestra por espectrofotometría (Nanodrop 3300, Thermo Scientific™). Para el cálculo de concentración, se consideró que una unidad de A₂₆₀ equivale a 50 µg/ml de ADN. Se evaluó la relación A₂₆₀/A₂₈₀ y se consideró ADN puro cuando la relación estuvo entre 1,6 a 1,9. Además se evaluó la relación A₂₆₀/A₂₃₀, considerándose óptimo entre 2,0 a 2,2.

Almacenamiento: Las muestras se guardaron a -20°C para su posterior utilización.

4.2.2.2. Aislamiento de ADN de líneas celulares

Para la extracción de ADN de las líneas celulares, se utilizó el reactivo DNAzol® (Invitrogen™, Thermo Scientific™). El procedimiento se realizó bajo las instrucciones del proveedor:

Lisis celular: Se adicionó 100 µl de DNAzol® por cada 1-3 x10⁶ células contenidas en el pellet celular. Luego se lisaron las células pipeteando enérgicamente.

Centrifugación: Se centrifugó a 10.000 g por 10 min a 4°C para remover el *debris* celular. Después se transfirió el sobrenadante viscoso a un tubo Eppendorf limpio.

Precipitación de ADN: Se adicionó al lisado 50 µl de etanol 100% frío por cada 100 µl de DNAzol® agregados previamente. Se mezcló por inversión y se dejó reposar por 3 min a T°_a. Luego con un tip se sujetó el ADN contra la pared del tubo y se descartó el sobrenadante por volcado.

Lavado: Se realizaron dos lavados con 80 µl de etanol 75%, entre cada uno se dejó reposar por 1 min y se descartó el sobrenadante con cuidado de no tocar el pellet.

Solubilización del ADN: Se dejó secar el pellet con el tubo invertido sobre papel absorbente por 20-30 seg. Luego se resuspendió el ADN en 100 μ l de NaOH 0,8 mM y se homogenizó. En caso de ser necesario se colocó la muestra en baño de agua a 40°C, para ayudar a la solubilización del ADN. Finalmente, se ajustó el pH a 7,5 agregando Buffer HEPES 0,1 M.

Cuantificación y pureza: Se evaluó la concentración y parámetros de pureza del ADN, mediante espectrofotometría (Nanodrop 3300, Thermo Scientific™).

Almacenamiento: Se guardó el ADN a -20°C para su posterior utilización.

4.2.2.3. Clean up del ADN

En caso de que la relación A_{260}/A_{230} estuviera muy por debajo del rango óptimo (2,0-2,2) y fuera necesario limpiar el ADN de residuos de reactivos utilizados en la purificación, se procedió a la limpieza del ADN.

4.2.2.3.1. Clean up del ADN con LiCl

Precipitación del ADN: Se agregó LiCl 4 M en una proporción 1/20 a la muestra a limpiar. Luego se añadieron dos volúmenes de etanol 100% frío (-20°C) y se dejó reposar a 4°C por 15 min. Finalmente se centrifugó por 15 min a 18.000 g y se descartó el sobrenadante con mucho cuidado de no remover el pellet.

Limpieza del ADN: Se agregó 100 μ l de etanol 70%, se centrifugó a 18.000 g por 10 min y se descartó el sobrenadante con cuidado. Se repitió este proceso una vez más.

Resuspensión del ADN: Se resuspendió el ADN en el volumen de agua destilada estéril apirógena (Roux) adecuado para la concentración inicial de la muestra.

Cuantificación y pureza: Se evaluó la concentración y parámetros de pureza del ADN por espectrofotometría (Nanodrop 3300, Thermo Scientific™).

Almacenamiento: El ADN se guardó a -20°C para su posterior utilización.

4.2.2.3.2. Clean up del ADN con Glucógeno

Precipitación del ADN: Se agregó a la muestra 1 μ l de glucógeno concentración 10 μ g/ μ l, (concentración final \approx 4 μ g/ μ l). Luego se añadieron dos volúmenes de isopropanol 100% frío (-20°C), y se dejó reposar a 4°C por 15 min. Finalmente se

centrifugó por 15 min a 18.000 g y se descartó el sobrenadante con mucho cuidado de no remover el pellet.

Limpieza del ADN: Se agregó 100 µl de etanol 70%, se centrifugó a 18.000 g por 10 min y se descartó el sobrenadante con cuidado. Se repitió este proceso una vez más.

Resuspensión del ADN: Se resuspendió el ADN en el volumen de agua destilada estéril apirógena (Roux) adecuado para la concentración inicial de la muestra.

Cuantificación y pureza: Se evaluó la concentración y parámetros de pureza del ADN por espectrofotometría (Nanodrop 3300, Thermo Scientific™).

Almacenamiento: El ADN se guardó a -20°C para su posterior utilización.

4.2.3. Determinación de mutaciones frecuentes en MCH en biopsias de pacientes

4.2.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (NESTED-PCR)

Se analizaron las siguientes regiones génicas; BRAF exón 15; NRAS exón 2 y 3; CDKN2A exones 1a y 2; TP53 exones 5, 6, 7 y 8; RAC1 exón 2, PTEN exón 5 y el promotor de TERT entre las posiciones -208 pb a -48pb pb. La amplificación se realizó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (Nested-PCR), que consiste en dos reacciones de PCR seguidas, cada una con un juego de primers específicos diferente. El producto de la primera amplificación (PCR-L) actúa como molde para la segunda reacción (PCR-S), y finalmente se obtiene un producto contenido dentro del primer amplicón. Esta técnica permite aumentar la sensibilidad del método, lo cual es necesario en el caso de muestras FFPE, ya que el ADN obtenido a partir de este tipo de muestras se encuentra altamente fragmentado. Para las Nested-PCR se empleó el termociclador de 96 pocillos “VeriFlex” de Applied Biosystems.

4.2.3.2. Primers

Para la obtención de los primers para Nested-PCR, en primer lugar se realizó una revisión bibliográfica y los primers hallados se evaluaron utilizando los software Vector NTI™ 11 y Primer Blast (NCBI). Para la elección, se priorizó que la mutación a evaluar se encontrara a más de 30 pb del comienzo o fin del amplicón, y que el tamaño de éste fuera lo más pequeño posible, dada la fragmentación del ADN extraído a partir de las biopsias FFPE.

Un requisito muy importante fue que los primers fueran específicos para las regiones de interés. Además, se contemplaron los parámetros termodinámicos: diferencia de T° de *melting* (T°_m) y de %GC entre primers; tendencia a formación de dímeros de primers, *dúplex* o *hairpin loops*; presencia de palíndromos o repeticiones (Dieffenbach and Lowe 1993).

Ya que los primers se utilizaron en Nested-PCR, se tuvo en cuenta la formación de *dúplex* entre primers de los pares L y S. Así como se intentó que las T°_m de ambos pares difieran en algunos grados, para evitar la formación de productos cruzados.

En caso de que ninguno de los pares de primers hallados cumpliera con los requisitos se diseñaron nuevos pares de primers con el programa Vector NTI™ 11 y se evaluaron teniendo en cuenta las mismas consideraciones. Se diseñaron 14 pares de primers.

Los veinticuatro pares de primers utilizados en las doce Nested-PCRS se detallan en las TABLA II y III.

TABLA II. **Primers L utilizados en Nested-PCR.** Temperatura de *annealing*, tamaño del amplicón y secuencias del primer Fw y Rv 5`-3`.

PCR L					
Nombre	T°_{ann} *	Amp [†]	Secuencia L_Fw	Secuencia L_Rv	Ref.
BRAF	56°C	354 pb	TTGACTCTAAGAGGAAAGATG	TTGAGACCTTCAATGACTTTCTAGT	-
NRASG12/G13	58°C	332 pb	GGCCGATATTAATCCGGTGT	TCCGACAAGTGAGAGACAGG	(Dika et al. 2013)
NRASQ61	54°C	299 pb	AAATTGAACTCCCTCCCTC	GGTAACCTCATTTCCTCCATA	-
RAC1	57°C	307 pb	TCAGGGTACCAATGTGTATGTGGTG	TGGTCAAAGAAATGTGAAACCCGT	(Kawazu et al. 2013)
TERT_prom	58°C‡	474 pb	CTGGCGTCCCTGCACCCTGG	ACGAACGTGGCCAGCGGCAG	(Horn et al. 2013)
PTEN_5	50°C	385 pb	GCAACATTTCTAAAGTTACCTA	CTGTTTTCCAATAAATTCTCA	(Gasparotto et al. 1999)
TP53_5	57°C	351 pb	GCCGTCTTCCAGTTGCTTTA	AGGAGGGGCCAGACCTAAGA	-
TP53_6	57°C	311 pb	AGCGCTGCTCAGATAGCGAT	TAAGCAGCAGGAGAAAGCCC	(Verselis et al. 2000)
TP53_7	55°C	318 pb	CTGCTTGCCACAGGTCTC	GTAAGGAGATTCCCCGCC	-
TP53_8	57°C	293 pb	TTTAAATGGGACAGGTAGGACC	GGAAAGAGGCAAGGAAAGGT	-
CDKN2A_1a	57°C	527 pb	GGGTGCCACATTCGCTAAGT	AAAACCTCCCAGGAAGCCTC	-
CDKN2A_2	56°C	432 pb	TGAGGGGGCTCTACACAA	GCTTTGGAAGCTCTCAGG	-

* T°_{ann} = Temperatutra de *annealing*; † Amp= amplicón; ‡ $T^{\circ}_{annealing}$ final, se utilizó Touchdown PCR (apartado 3.2.3.4)

TABLA III. **Primers S utilizados en Nested-PCR.** Nombre de primers, temperatura de *annealing*, tamaño del amplicón, secuencia de los primer Fw y Rv 5`-3`.

PCR S					
Nombre	T° ann *	Amp [†]	Secuencia L_Fw	Secuencia L_Rv	Ref.
BRAF	60°C	277 pb	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG	GCATCTCAGGGCCAAAAAT	(Ahn et al. 2013)
NRASG12/G13	58°C	239 pb	AGAACCAAATGGAAGGTAC	CCTCTATGGTGGGATCATATTC	-
NRASQ61	60°C	243 pb	CCCCTTACCCTCCACACC	CACAAAGATCATCCTTTCAGAGAA	(Yilmaz et al. 2015)
RAC1	58°C	163 pb	AAGCTAAGATTACATTCATGTTGAC	AACACAAACAGGTTAATTCCCAAT	
TERT_prom	52°C‡	162 pb	TCCTGCCCTTCACCTTCC	CAGCGCTGCCTGAAACTCG	(Zheng et al. 2014)
PTEN_5	56°C	290 pb	CCACAGTTGCACAATATCC	TCAGATCCAGGAAGAGGA	-
TP53_5	58°C	287 pb	TTTCAACTCTGTCTCCTTCCTC	ATCAGTGAGGAATCAGAGGC	-
TP53_6	58°C	223 pb	GAGAGACGACAGGGCTGGTT	ACCACCTTAACCCCTCCTC	-
TP53_7	58°C	258 pb	CTCATCTTGGGCCTGTGTTA	GATGAGAGGTGGATGGGTAG	-
TP53_8	58°C	219 pb	GACCTGATTTCTTACTGCCT	TCTCCTCCACCGCTTCTT	(Verselis et al. 2000)
CDKN2A_1a	60°C	340 pb	GAAGAAAGAGGAGGGGCT	GCGCTACCTGATTCCAATTC	(Monzon et al. 1998)
CDKN2A_2	56°C	348 pb	GACCATTCTGTTCTCTCTGG	CAGATCATCAGTCTCACCT	-

* T° ann= Temperatutra de *annealing*; † Amp= amplicón; ‡ T° de *annealing* final, se utilizó Touchdown PCR (apartado 3.2.3.4)

4.2.3.3. Condiciones de amplificación

En todas las Nested-PCRs, excepto en el promotor de TERT, se utilizaron los siguientes reactivos: GoTaq® DNA Polymerase, 5X Green Buffer (con MgCl₂), dNTPs (Promega); primers específicos (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™), agua destilada libre de nucleasas (Roux) y ADN molde en las proporciones detalladas en la TABLAS IV y V.

En cada Nested-PCR, tanto en la PCR-L como en la PCR-S, se utilizó el programa de ciclado detallado en la TABLA VI (excepto el promotor de TERT). En las PCRs-L, se utilizaron T°_{ann} entre 3-5°C más bajas a las estimadas por los software Vector NTI™ 11 y Primer Blast (NCBI) para aumentar el rendimiento de la reacción. En cambio, en las PCRs-S se buscó una T°_{ann} que favoreciera la especificidad de la reacción. La T°_{ann} de cada reacción se detalla en la Tablas IV y V.

TABLA IV. **Mix de amplificación.** Nested-PCR de BRAF exón 15, TP53 exón 7 y CDKN2A exones 1a y 2.

PCR L				PCR S			
Reactivo	[Stock]	[Final]	Vol.[1rx]	Reactivo	[Stock]	[Final]	Vol.[1rx]
Green Buffer	[5X]	[1X]	4 µl	Buffer	[5X]	[1X]	10 µl
MgCl₂	[7,5 µM]	[1,5 µM]	-	MgCl₂	[7,5 µM]	[1,5 µM]	-
dNTPs	[10 mM]	[100 µM]	0,2 µl	dNTPs	[10 mM]	[100 µM]	0,5 µl
Primer Fw_L	[10 µM]	[0,25 µM]	0,5 µl	Primer Fw_S	[10 µM]	[0,25 µM]	1,25 µl
Primer Rv_L	[10 µM]	[0,25 µM]	0,5 µl	Primer Rv_S	[10 µM]	[0,25 µM]	1,25 µl
Taq Pol.	[5 U/ µl]	[0.025 U/µl]	0,1 µl	Taq Pol.	[5 U/µl]	[0.025 U/µl]	0,25 µl
H₂Od	-	-	13,2 µl	H₂Od	-	-	35,25 µl
ADN	[20ng/ µl [†]]	[30ng]	1,5 µl	Amp. L*	-	-	1,5 µl
Total	-	-	20 µl	Total	-	-	50 µl

† En aquellos casos en que la concentración del ADN fue a 20ng/µl se preparó una mix de amplificación adaptada. * Amp. L = Amplificación del amplicón de la PCR-L.

Tabla V. **Mix de amplificación.** Nested-PCR de NRAS exones 2 y 3, TP53 exones 5,6 y 8, RAC1 exón 2 y PTEN exón 5.

PCR L				PCR S			
Reactivo	[Stock]	[Final]	Vol.[1rx]	Reactivo	[Stock]	[Final]	Vol.[1rx]
Green Buffer	[5X]	[1X]	4 µl	Buffer	[5X]	[1X]	10 µl
MgCl₂	[7,5 µM]	[1,5 µM]	-	MgCl₂	[7,5 µM]	[1,5 µM]	-
dNTPs	[10 mM]	[100 µM]	0,2 µl	dNTPs	[10 mM]	[100 µM]	0,5 µl
Primer Fw_L	[10 µM]	[0,10 µM]	0,2 µl	Primer Fw_S	[10 µM]	[0,40 µM]	2,0 µl
Primer Rv_L	[10 µM]	[0,25 µM]	0,2 µl	Primer Rv_S	[10 µM]	[0,25 µM]	2,0 µl
Taq Pol.	[5 U/ µl]	[0.025 U/µl]	0,1 µl	Taq Pol.	[5 U/µl]	[0.025 U/µl]	0,25 µl
H₂Od	-	-	13,8 µl	H₂Od	-	-	33,75 µl
ADN	[20ng/ µl [†]]	[30ng]	1,5 µl	Amp. L*	-	-	1,5 µl
Total	-	-	20 µl	Total	-	-	50 µl

† En aquellos casos en que la concentración del ADN fue a 20ng/µl se preparó una mix de amplificación adaptada. * Amp. L = Amplificación del amplicón de la PCR-L.

TABLA VI. **Programa utilizado en las Nested-PCR.**

<i>Etapa</i>	<i>Ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
Desnaturalización	1	95°C	3 min
Ciclado	40	Desnaturalización	95°C 30 seg
		Annealing	Variable 30 seg
		Extensión	72°C 30 seg
Extensión final	1	72°C	5 min

4.2.3.4. Amplificación del promotor de TERT por Touchdown-PCR

La secuencia del promotor de TERT, (por ser una región promotora) tiene un contenido de GC mayor al 65%, lo cual lo convierte en un templado difícil para su amplificación, por su alta T_m y formación de estructuras secundarias estables. Por lo tanto, para su amplificación y posterior secuenciación se tuvieron en cuenta algunas consideraciones especiales.

Se utilizó el programa de ciclado Touchdown-PCR (TD-PCR) que consiste en emplear T°_{ann} cada vez más bajas, empezando con una T°_{ann} por encima de la estimada e iría disminuyendo sucesivamente durante 10-15 ciclos hasta una T°_{ann} más permisiva. Este programa en su conjunto permite aumentar tanto la especificidad en los primeros ciclos, como la sensibilidad de la reacción en los ciclos posteriores (Korbie and Mattick 2008). Esto se utilizó en las dos reacciones de la Nested-PCR. Además, para la amplificación de esta región promotora se utilizó una polimerasa *hot-start* de muy alta fidelidad (100 veces mejor que la Taq Pol).

Para la mix de amplificación se emplearon los siguientes reactivos: Platinum™ Superfi™ DNA Polymerase, 5X Superfi Buffer (con $MgCl_2$), 5X Superfi GC Enhancer (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific™); primer Tert_prom Fw y Tert_prom Rv (S o L); dNTPs; agua destilada libre de nucleasas y ADN molde, en las concentraciones que se indican en la TABLA VII.

TABLA VII. Mix de amplificación. Nested-PCR del promotor de TERT.

PCR L				PCR S			
Reactivo	[Stock]	[Final]	Vol.[1rx]	Reactivo	[Stock]	[Final]	Vol.[1rx]
Superfi Buffer	[5X]	[1X]	4 μ l	Superfi Buffer	[5X]	[1X]	10 μ l
GC Enhancer	[5X]	[1X]	4 μ l	GC Enhancer	[5X]	[1X]	10 μ l
MgCl ₂	[7,5 μ M]	[1,5 μ M]	-	MgCl ₂	[7,5 μ M]	[1,5 μ M]	-
dNTPs	[10 μ M]	[200 μ M]	0,4 μ l	dNTPs	[10 μ M]	[200 μ M]	1 μ l
TERT Fw_L	[10 μ M]	[0,25 μ M]	0,5 μ l	TERT Fw_S	[10 μ M]	[0,5 μ M]	2,5 μ l
TERT Rv_L	[10 μ M]	[0,25 μ M]	0,5 μ l	TERT Rv_S	[10 μ M]	[0,5 μ M]	2,5 μ l
Superfi Pol.	[2 U/ μ l]	[0.02 U/ μ l]	0,2 μ l	Superfi Pol.	[2 U/ μ l]	[0.02 U/ μ l]	0,5 μ l
H ₂ Od	-	-	8,4 μ l	H ₂ Od	-	-	22 μ l
ADN	[20ng/ μ l [†]]	[40ng]	2 μ l	Amp. L*	-	-	1,5 μ l
Total	-	-	20 μl	Total	-	-	50 μl

[†] En aquellos casos en que la concentración del ADN fue a 20ng/ μ l se preparó una mix de amplificación adaptada. *Amp. L = Amplificación del amplicón de la PCR-L.

Se emplearon los programas de amplificación que se detallan en las TABLAS VIII y IX, donde la etapa de ciclado se divide en dos fases.

TABLA VIII. Programa TD-PCR-L para la amplificación del promotor de TERT.

PCR L				
Etapa		Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización		96,5°C	5 min	1
Ciclado	1º Fase	Denaturalización	96°C	30 seg
		<i>Annealing</i>	Desde 70 a 58°C	30 seg
		Elongación	72°C	30 seg
	2º Fase	Denaturalización	96°C	30 seg
		<i>Annealing</i>	58°C	30 seg
	Elongación	72°C	30 seg	
Elongación		72°C	7 min	1

TABLA IX. Programa TD-PCR-S para la amplificación del promotor de TERT.

PCR S				
Etapa		Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización		96,5°C	5 min	1
Ciclado	1º Fase	Denaturalización	96°C	30 seg
		<i>Annealing</i>	Desde 70 a 58°C	30 seg
		Elongación	72°C	30 seg
	2º Fase	Denaturalización	96°C	30 seg
		<i>Annealing</i>	58°C	30 seg
	Elongación	72°C	30 seg	
Elongación		72°C	7 min	1

4.2.3.5. Controles de Nested-PCR

En cada Nested-PCR se realizaron dos tipos de controles:

- Control negativo: agua en lugar de templado.
- Control positivo: ADN de líneas celulares como templado.

El control positivo cumplió un doble rol. En primer lugar, como control interno de cada corrida, y en segundo lugar como control de secuenciación. Es decir, se utilizaron líneas celulares de las que se sabía *a priori* la secuencia en la posición o región a analizar, para descartar cualquier contaminación que pueda haber ocurrido durante el proceso de

amplificación. En los casos que fueron posibles se empleó una línea celular *wild type* (WT) y otra mutada (MUT). En las Nested-PCR para las que no se consiguieron líneas celulares con una mutación en el *hot spot* o exón en estudio, igual se utilizaron dos líneas de las que se supiera su secuencia *a priori* (TABLA X).

TABLA X. Líneas celulares utilizadas como control positivo en Nested-PCR.

	Control Positivo 1		Control Positivo 2	
	Línea celular	Estatus	Línea celular	Estatus
BRAF	MEL-XY11	WT	MEL-XY3	BRAF ^{V600E}
NRASG12/G13	MEL-XY3	WT	MEL-XY15	WT
NRASQ61	MEL-XY3	WT	MEL-X9	NRAS ^{Q61K}
RAC1	MEL-XY3	WT	MEL-XX15	RAC1 ^{P29S}
CDKN2A_2	MEL-XY2	DEL*	MEL-XY3	CDKN2A ^{R80*}
CDKN2A_1α	MEL-XX15	WT	MEL-XY3	DEL
TP53_5	MEL-XY3	WT	MEL-XX15	WT
TP53_6	MEL-XY3	WT	MEL-XX15	WT
TP53_7	MEL-XY3	WT	DLD-1	TP53 ^{S241F}
TP53_8	MEL-XY3	WT	HT-29	TP53 ^{R273H}
PTEN_5	MEL-XX15	WT	MEL-XY3	DEL
TERT_prom	MEL-XY2	TERT ^{C-146T}	MEL-XX15	TERT ^{C-124T; C-146T}

* DEL= delección del gen.

4.2.3.6. Evaluación de los productos obtenidos

El resultado de cada Nested-PCR fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa 2% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), teñido con Bromuro de Etidio. Se sembraron 5µl o 10 µl de cada muestra y se utilizó el marcador de peso molecular Móvil Puc19/ MspI (FIL) o el 100 bp *DNA Ladder* (Promega). Los geles se corrieron a 95 V por 30 min, en Buffer TAE 1X (Tris 40mM, ác. Acético 20mM, EDTA 1mM). Los resultados se registraron exponiendo el gel a luz UV (435-490nm), mediante el fotodocumentador UVP Life Science.

4.2.4. Análisis de Secuencias

Los productos de PCR fueron secuenciados por el método de Sanger a través del secuenciador capilar Applied Biosystems 3730xl de la empresa MacroGen Corporation

USA. Los productos de la amplificación del promotor de TERT fueron enviados en un programa optimizado para templados difíciles. Se realizó una doble lectura de los amplicones, por lo tanto se obtuvieron cromatogramas de la secuencia *forward* (Fw) y *reverse* (Rv) para cada muestra.

En cada reacción de Nested-PCR se utilizó ADN de líneas celulares como control. Por lo tanto, en primer lugar se chequeó el resultado de cada control. Luego en cada caso se examinó que la mutación se encuentre tanto en la lectura Fw como en la Rv, y en caso de que quedaran dudas sobre la identidad de alguna posición se pidió la resecuenciación de la muestra o se confirmó con una segunda vuelta de amplificación y secuenciación.

Los cromatogramas fueron analizados mediante los programas Chromas versión 1.62, que permite visualizar el cromatograma y buscar una secuencia en particular, y el *Mutation Surveyor* versión 3.97, el cual permite identificar mutaciones comparando la secuencia obtenida con una referencia. En la Figura 3.1 se pueden ver las pantallas de resultados que devuelve el programa.

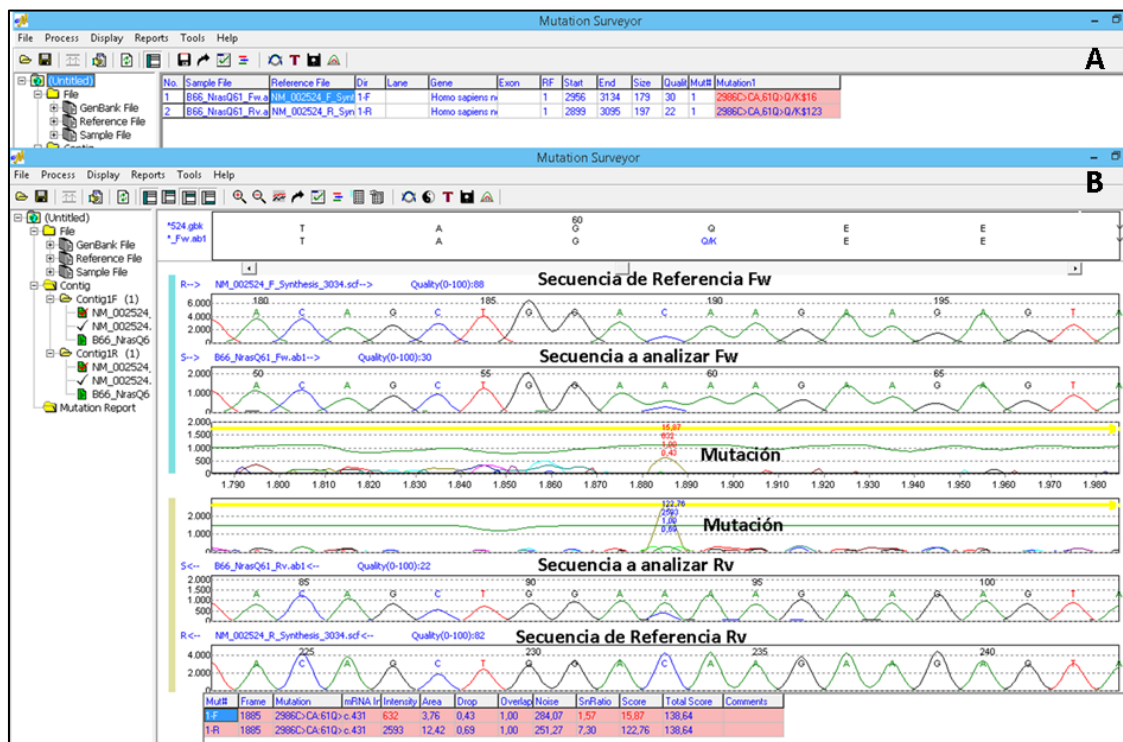


Figura 3.1. **Análisis de secuencias.** Cromatogramas Fw y Rv de la línea celular MEL-XY9, por el programa Mutation Surveyor. Se analizó el exón 3 de NRAS, donde se reporta la mutación Q61K.

En la pantalla A, se ve el *Mutational report* donde se listan los archivos cargados en la columna *Sample file* (secuencias Fw y Rv), seguido de la columna *Reference file*, donde aparece la secuencia de GenBank con la cual las secuencias cargadas fueron alineadas. Luego se indica la calidad de la secuencia cargada como *Quality*, que es una medida de la proporción *signal/noise* (S/N) en la muestra, anterior a su alineamiento con la referencia. Por último se reportan las mutaciones halladas en la columna *Mutation*.

En la pantalla B se ve el *Graphical Analysis Display Layout*, donde se visualiza el alineamiento entre las secuencias cargadas y la referencia. Cuando en una posición dada hay una mutación aparece un *Mutation peak*. La mutación se reporta únicamente si los valores de los parámetros, *Overlapping factor*, *Dropping factor*, *S/N ratio*, *Peak Height* y *Mutation Score*, caen dentro de los valores preestablecidos en el programa. El *Peak Height* se define como la mínima altura requerida para que un pico en la cadena de mutaciones sea considerado un *Mutation Peak*. Por default, este valor es de 500 RFU. El *Mutation score* indica el nivel de confianza con el que se determina la mutación. Está basado en el concepto de Phred Scores, donde la calidad del score está logarítmicamente ligada a las probabilidades de error (debe ser mayor a 5 RFU). El *Overlapping factor* mide la diferencia entre el área del pico de referencia y el pico de la mutación, debe ser mayor a 0,20 por default. El *Dropping Factor* en una mutación homocigota es 1 y de una heterocigota es 0,5. Debe ser mayor o igual a 0,20 para que una mutación se reporte. La *Proporción S/N* indica cuán grande debe ser la señal con respecto al ruido para que una mutación sea registrada. El ruido mínimo en una posición es de 250 RFU. Finalmente se informa un *Total Score*, que engloba los parámetros anteriores.

4.2.5. Análisis de variación del número de copias de los genes PTEN y CDKN2A por Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

4.2.5.1. Descripción del procedimiento

Para el análisis de variación del número de copias de los genes PTEN (cromosoma 10) y CDKN2A (cromosoma 9) se empleó la técnica Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH). Para esto se utilizaron las sondas optimizadas para tejido incluido en FFPE ZytoLight® SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe y SPEC CDKN2A/CEN 9 Dual Color Probe, respectivamente (Figura 3.2). Ambas contienen una mezcla de dos sondas, una

específica para el ADN alfa satelital del centrómero del cromosoma (marcado con un fluoróforo naranja) y otra específica para la región del cromosoma que contiene el gen en estudio (marcado con un fluoróforo verde).

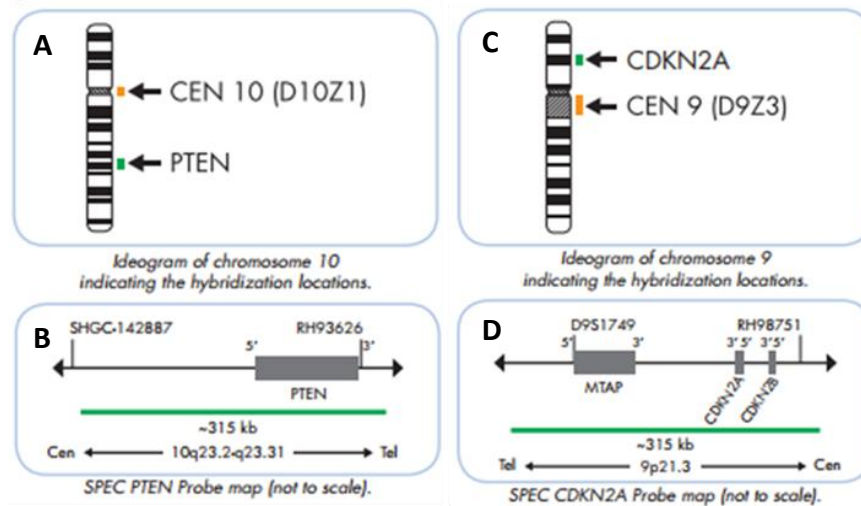


Figura 3.2. **Ideograma de los sitios de hibridación de las sondas utilizadas.** A. Esquema del cromosoma 10. Se señala la sonda del centrómero (naranja) y la sonda específica para PTEN (verde). B. Se muestra la región en la cual hibrida la sonda de PTEN. C. Esquema del cromosoma 9. Se indica la sonda del centrómero (naranja) y la sonda específica para CDKN2A (verde). D. Se muestra la región con la cual la sonda es complementaria, en este caso también incluye los genes CDKN2A y MTAP.

La hibridación se realizó sobre secciones de 4 µm del tumor incluido en FFPE en vidrios con carga positiva. Se realizó únicamente en aquellas biopsias en las que no se había obtenido producto en la Nested-PCR de PTEN (exón 5) y/o CDKN2A (exones 1α y 2); lo cual es un indicio de que puede haber delección del gen.

Para los controles se utilizaron líneas celulares de MCH, establecidas previamente en el laboratorio, las cuales se crecieron en cultivo *in vitro* hasta recolectar 5x 10⁶ células. Luego se fijaron en formaldehído 4% en PBS por 24 h y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 4 µm de espesor al igual que en los tumores de pacientes.

Controles de la sonda específica para el gen PTEN:

- Control positivo de hibridación: Línea MEL-XY2 PTEN^{+/+}. Cromosoma 10 poliploide.
- Control positivo de deleción: Línea MEL-XY3 PTEN^{-/-} en el 90% de las células.

Controles de la sonda específica para el gen CDKN2A:

- Control positivo hibridación: Línea MEL-XY3 CDKN2A^{+/+}. Cromosoma 9 poliploide.
- Control negativo: Línea MEL-XX4 CDKN2A^{-/-} en el 70% de las células, cromosoma 9 poliploide.

Se siguieron las instrucciones y recomendaciones del proveedor comercial (Zitovision GmbH). Las incubaciones se realizaron en el equipo *Hybridizer Dako Cytomation* (placa calefactora que permite crear una cámara húmeda). Brevemente, el protocolo utilizado fue el siguiente:

Día 1- Pretratamiento (Desparafinación/Proteólisis): Se incubaron los portaobjetos a 70°C durante 10 min en una placa calefactora. Luego se colocaron los vidrios en un coplin y se incubaron en Xilol 2 veces por 10 min. Se incubaron 2 veces en etanol 100%, y luego una vez en etanol 90% y 70% por 5 min. Finalmente se lavó 2 veces por 2 min en agua deionizada.

Después los portaobjetos se incubaron durante 15 min en Heat Pretreatment Solucion Citric (kit) precalentado en baño de agua a 98°C. Se trasladaron los vidrios a un coplin con agua deionizada y se lavaron 2 veces por 2 min, posteriormente se dejaron escurrir los portaobjetos para visualizar donde estaba el tejido, cuidando que este no se seque totalmente.

Se colocaron los portaobjetos en la placa calefactora a 37°C y se añadió gota a gota la Pepsin Solution (kit) de modo que cubra la sección de tejido o células. Se incubaron durante 6 min las biopsias y durante 5 min las células en cámara húmeda.

Por último, se lavaron los portaobjetos por 5 min en Wash Buffer SSC (kit) y por 1 min en agua deionizada. Se deshidrató el tejido incubando en etanol 70%, 90% y 100% por 1 min sucesivamente. Se dejó que las secciones se sequen al aire.

Día 1- Desnaturalización e hibridación: Se pipetearon 5 a 10 µl de la sonda Zytolight FISH correspondiente sobre el material de análisis. Luego se cubrió la muestra con un cubreobjetos con cuidado de que no queden burbujas.

Se desnaturalizaron los portaobjetos a 75°C en la placa calefactora por 10 min y posteriormente se incubó en cámara húmeda por 14 h para que tenga lugar la hibridación de las sondas.

Día 2- Post-hibridación y detección: Se pusieron los portaobjetos en un coplin con 1X Wash Buffer A (kit) a 37°C hasta que se despegó el cubreobjetos (1-3 min). Luego se realizaron 2 lavados más, con la misma solución a la misma temperatura, durante 5 min. Se deshidrataron los portaobjetos incubando por 1 min en etanol 100%, 90%, 70% sucesivamente y se dejaron secar por 15 min protegidos de la luz.

Se pipetearon 10 µl de DAPI/DuraTect-Solution (kit) sobre el tejido y se cubrió con un cubreobjetos. Se selló y se dejó reposar unos minutos en la oscuridad.

La evaluación de los objetos de estudio se llevó a cabo en el microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX53). Las fotos fueron registradas con la cámara OLYMPUS DP72.

4.2.5.2. Análisis de los resultados

El análisis de resultados de FISH fue realizado en colaboración con la Dra. Alicia Inés Bravo especialista en Patología del Hospital Interzonal de Agudos “Eva Perón”, San Martín.

Las siguientes consideraciones fueron tenidas en cuenta para elegir la región tumoral óptima a examinar: se identificó la zona tumoral previamente en una sección adyacente a la que se realizó FISH teñida con H&E; se seleccionaron campos donde los núcleos fueran fácilmente enumerables (evitándose aquellas áreas donde hubiera superposición de células o los bordes no eran definidos); se chequeó la hibridación de las sondas en regiones de tejido sano como referencia.

Se evaluaron entre 30-75 células dependiendo de la heterogeneidad del preparado. En cada célula se contó el número de señales verdes (gen en estudio) y rojas (centrómero). En cada caso se informó el porcentaje de cada una de las siguientes poblaciones de células:

- 2;2: dos señales rojas y dos señales verdad. Células con dos alelos del gen en estudio.
- 2;1: dos señales rojas y una verde. Células con delección hemicigota del gen en estudio.
- 2;0: dos señales rojas. Células con delección homocigota del gen en estudio.
- 1;1: una señal roja y una verde. Células con delección heterocigota del cromosoma en estudio.
- 1;0: una señal roja. Células con delección homocigota del gen en estudio y delección heterocigota del cromosoma en estudio.
- Otras alteraciones. Células poliploides con más de dos señales rojas.

Se consideró que el tumor tenía un número de copias del gen en estudio alterado, cuando las poblaciones 2;1, 2;0, 1;1, 1;0 superó el 30% de células contadas (Yoshimoto et al. 2007).

4.2.6. Análisis Estadístico

Se utilizaron los programas estadísticos Infostat y GraphPad Prim 5. Para las comparaciones entre grupos se utilizó el test de Wilcoxon o el Test exacto de Fisher, dependiendo de la naturaleza de la variable. Para estimar la sobrevida libre de metástasis a distancia se utilizó la función no paramétrica Kaplan-Meier y su significancia fue evaluada mediante el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon. La correlación entre variables se estudió mediante el Coeficiente de correlación de Spearman. Los gráficos biplot se construyeron a partir de un Análisis de Componentes Principales. Se consideraron significativos aquellos resultados con $p < 0,05$.

5. *RESULTADOS*

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y SU EVOLUCIÓN CLÍNICA

Este estudio exploratorio reunió 12 biopsias tumorales pertenecientes a 12 pacientes estadio III de MCH. Se utilizó el material disponible de cada paciente, por lo que 5 biopsias pertenecían a tumores primarios y 7 a metástasis tumorales. En cuanto a las localizaciones de los tumores metastásicos, 5 eran metástasis ganglionares y 2 metástasis cutáneas regionales. En las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 se ilustran las biopsias empleadas con imágenes representativas, tomadas de cortes teñidos con hematoxilina-eosina (H&E), con el microscopio de luz visible (ZEISS).

En cuanto a la distribución demográfica de la población en estudio, según el sexo de los pacientes, el 58,3% (7/12) eran mujeres y el 41,2% (5/12) hombres. La edad comprendía un rango de 29 a 61 años, con un promedio de 52 años.

En lo que respecta al tratamiento que recibieron estos pacientes, el 67% (8/12) se trató con la vacuna terapéutica CSF-470, el 25% (3/12) recibió IFN- α 2b en dosis intermedias, y un paciente no llegó a ser tratado (8%). Hasta la fecha los pacientes tuvieron un máximo de seguimiento de 87 meses.

Tumores Primarios

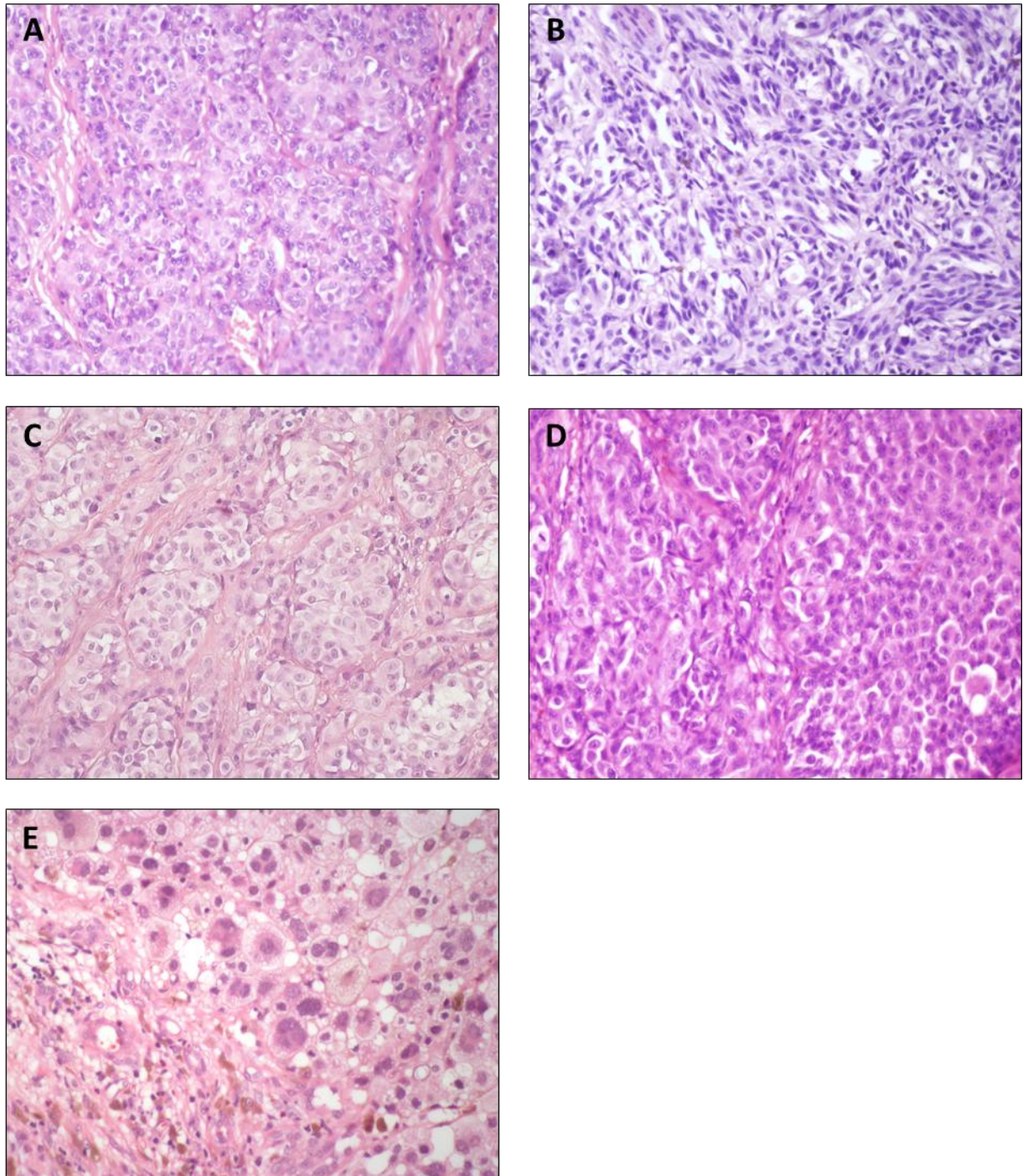


Figura 5.1. **Tumores primarios.** Aumento original 200X. Tinción H&E. A. Paciente 003; B. Paciente 009; C. Paciente 021; D. Paciente 022; E. Paciente 024.

Metástasis Ganglionares

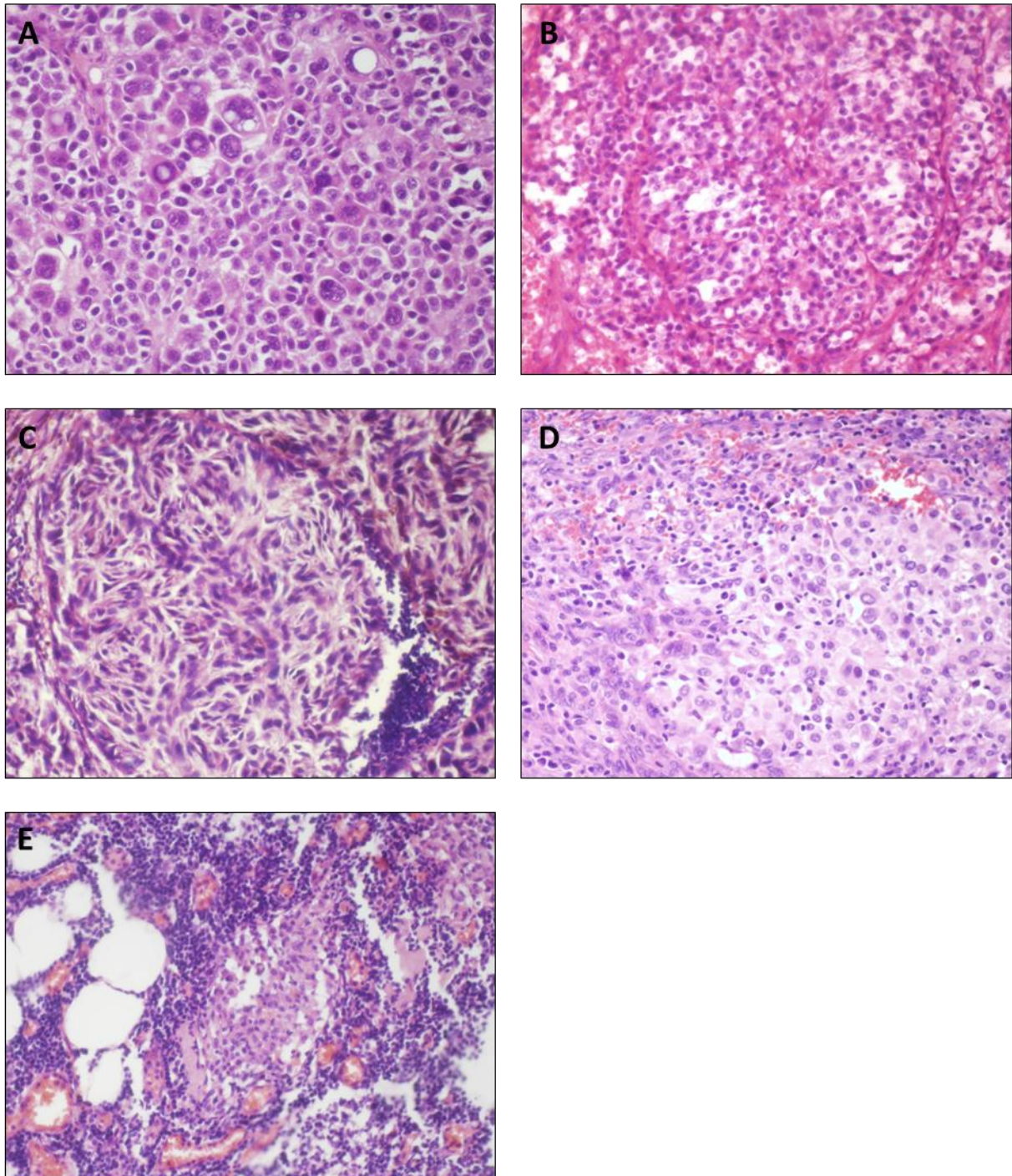


Figura 5.2. **Metástasis ganglionares.** Aumento original 200X. Tinción H&E. A. Paciente 012; B. Paciente 028; C. Paciente 041; D. Paciente 042; E. Paciente 045.

Metástasis cutáneas

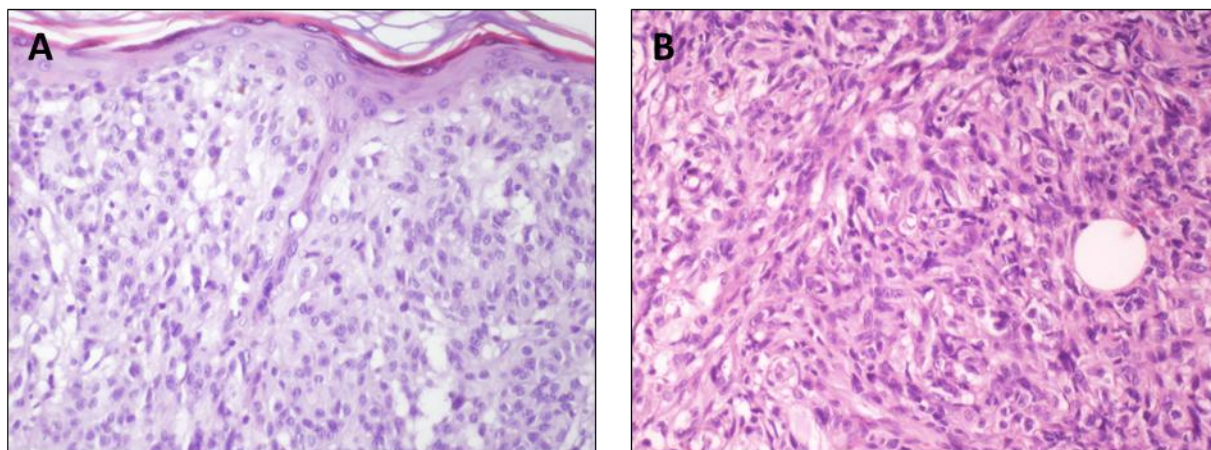


Figura 5.3. **Metástasis cutáneas.** Aumento original 200X. Tinción H&E A. Paciente 005; B. Paciente 025.

Con el fin de explorar si existe alguna diferencia en cuanto a las mutaciones frecuentes en MCH, entre los pacientes que responden al tratamiento con inmunoterapia (CSF-470 o INF α -2B) y aquellos que no lo hacen, se eligieron pacientes de muy mala evolución y de buena evolución. Estos pacientes se clasificaron en dos grupos dependiendo de la Sobrevida Libre de Metástasis a Distancia (por sus siglas en inglés DMFS): grupo A: pacientes progresados; grupo B: pacientes libres de metástasis a distancia. Las curvas de DMFS fueron significativamente diferentes entre los grupos ($p = 0,0018$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.4). En la TABLA XI, se detalla la distribución de las variables: edad, sexo, y tratamiento en cada uno de los grupos.

TABLA XI. **Distribución de variables.** Grupo A. Pacientes progresados. Grupo B. Pacientes libres de enfermedad a distancia.

Variable	Grupo A	Grupo B	p
Edad \bar{x} (rango)	46,2 (41-53) años	45,2 (29-61) años	$p > 0,05^{\ddagger}$
Sexo	50% M; 50% F	33% M; 67% F	$p > 0,05^{\ddagger}$
Tratamiento	50% CSF-470; 33% IFN- α 2b, 17% no tratado	83% CSF-470; 17% IFN- α 2b	$p > 0,05^{\ddagger}$

\ddagger Test de Gehan-Breslow-Wilcoxon; \ddagger Test Exacto de Fisher.

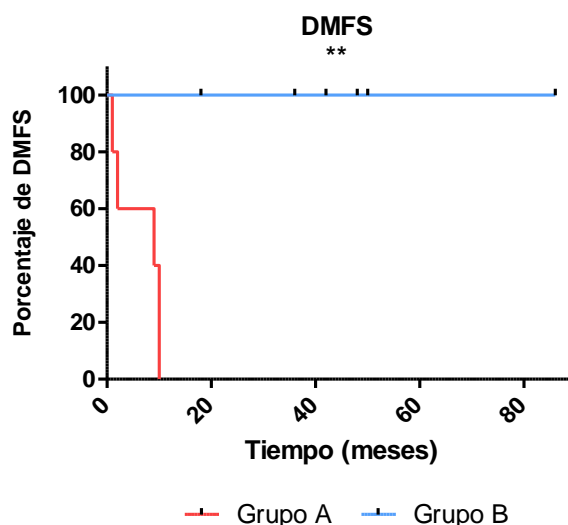


Figura 5.4. **Sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS).** Grupo A. Pacientes progresados. Grupo B. Pacientes libres de metástasis a distancia. (** p = 0,0018 test de Gehan-Breslow-Wilcoxon.)

5.2. DETERMINACIÓN DE LAS ALTERACIONES FRECUENTES EN MCH

5.2.1. Optimización de la metodología empleada

5.2.1.1. Comparación de protocolos de *Clean up del ADN*

Con el objetivo de mejorar la pureza del ADN obtenido, perdiendo la menor cantidad en el proceso, se evaluaron dos protocolos de *Clean up* del ADN, que difieren principalmente en el agente que se emplea para precipitar el ADN. En uno de ellos se utiliza LiCl 4 M, que neutraliza las cargas del ADN permitiendo que precipite; y en el otro glucógeno, que dado su alto peso molecular actúa como carrier para la precipitación. Ambos protocolos se especifican en la sección 4.2.2.3 de Metodología.

Se utilizaron las muestras que se detallan en las TABLAS XII y XIII, las cuales se eligieron porque presentaban distintos órdenes de concentraciones, así como una relación A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} fuera del rango óptimo, 2,0-2,2 y 1,8-2,0 respectivamente.

Cada muestra se dividió en dos volúmenes iguales y se realizaron ambos protocolos en paralelo. Luego de la purificación se evaluaron los parámetros: concentración, relación A_{260}/A_{230} , relación A_{260}/A_{280} , y % recuperación de ADN. Los resultados obtenidos se listan en la TABLAS XII y XIII.

TABLA XII. Resultados del *clean up* de la línea MEL-XX15.

MEL-XY3			
	Condición inicial	LiCl	Glucógeno
Concentración	729,3 ng/μl	335,2 ng/μl	116,2 ng/μl
A₂₆₀/A₂₃₀	0,69	1,88	1,40
A₂₆₀/A₂₈₀	2,2	1,88	1,86
% de Recup.	-	42%	15%

Todas las mediciones fueron realizadas con el espectrofotómetro Nanodrop 3300, Thermo Scientific™.

TABLA XIII. Resultados del *clean up* de la línea MEL-XY3.

MEL-XY3			
	Condición inicial	LiCl	Glucógeno
Concentración	96,4 ng/μl	95,9 ng/μl	41,9 ng/μl
A₂₆₀/A₂₃₀	0,11	1,94	1,36
A₂₆₀/A₂₈₀	2,09	1,99	1,94
% de Recup.	-	97%	43%

Todas las mediciones fueron realizadas con el espectrofotómetro Nanodrop 3300, Thermo Scientific™.

Con el protocolo a base de LiCl se recuperó aproximadamente dos veces más ADN en cada muestra que con el protocolo que utiliza glucógeno. Además, con el protocolo de LiCl se obtuvieron mejores parámetros de calidad, principalmente en cuanto a la relación A₂₆₀/A₂₃₀, ya que los valores obtenidos se acercan más al rango óptimo que utilizando el protocolo con glucógeno. Por lo tanto se adoptó el protocolo con LiCl como método de *clean up* de ADN.

5.2.1.2. Puesta a punto de Nested-PCRs

El objetivo principal de la puesta a punto de las PCRs fue utilizar la mínima cantidad posible de ADN de paciente. Brevemente, se realizaron los siguientes pasos de optimización:

En primer lugar se utilizó ADN de las líneas celulares MEL-XY3 y MEL-XX15 para la optimización de la T_{ann} de cada par de primers. En esta ocasión se emplearon 100 ng de ADN, 1,5 μM de Mg²⁺ y 0,25 μM de primers en un volumen final de 50 μl.

Luego, se ajustó la concentración de Mg²⁺ y la cantidad de ADN molde requerido, utilizando ADN de una línea celular y un paciente. Se ensayaron distintas concentraciones de Mg²⁺: 1,5 μM, 2,0 μM y 2,5 μM y dos cantidades de ADN templado: 100

ng y 50 ng. Se obtuvo una mayor cantidad de producto utilizando 50 ng de ADN como templado y 1,5 μM de Mg^{2+} (Figura 5.5).

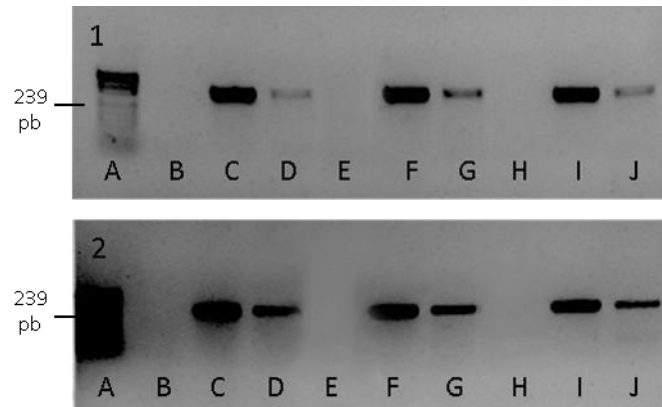


Figura 5.5. **Determinación de cantidad óptima de ADN y $[\text{Mg}^{2+}]$.** NRASG12/G13-S. Tamaño del amplicón: 239 pb. En cada condición se sembraron en el mismo orden: control negativo; control positivo y paciente 041. **Gel 1:** 100 ng de ADN. A. Marcador de peso molecular (MW) B, C, D. 1,5 μM $[\text{Mg}^{2+}]$; E, F, G. 2,0 μM $[\text{Mg}^{2+}]$; H, I, J. 2,5 μM $[\text{Mg}^{2+}]$. **Gel 2:** 50 ng de ADN. A. MP. B, C, D. 1,5 μM $[\text{Mg}^{2+}]$; E, F, G. 2,0 μM $[\text{Mg}^{2+}]$; H, I, J. 2,5 μM $[\text{Mg}^{2+}]$. Mejor condición: 50 ng de ADN como templado y 1,5 μM de Mg^{2+} .

Dado que el ADN recuperado de las biopsias tumorales FFPE se encuentra muy fragmentado, para aumentar la sensibilidad de la amplificación se decidió usar un protocolo de Nested-PCR, que se basa en dos PCRs consecutivas, donde la segunda reacción (PCR-S) utiliza como molde el producto de la primera reacción (PCR-L). Para esto se utilizan dos pares de primers diferentes, donde el amplicón del segundo par de primers (primers-S), está incluido dentro del amplicón producido por el primer par de primers (primers-L).

Por lo tanto, una vez que se puso a punto cada PCR por separado, se chequeó el funcionamiento de la Nested-PCR, utilizando en la PCR-L: 50 ng de ADN en 50 μl finales y en la PCR-S 1,5 μl de la PCR anterior como molde en un volumen final de 50 μl .

Con el fin de utilizar aún menos cantidad de ADN, se probó realizar la PCR-L con 30 ng de ADN molde en un volumen final de 20 μl . Como se muestra en la Figura 5.6, de este modo se obtuvo el mismo rendimiento que partiendo de 50 ng de ADN molde en 50 μl finales, por lo que se adoptó la nueva condición.

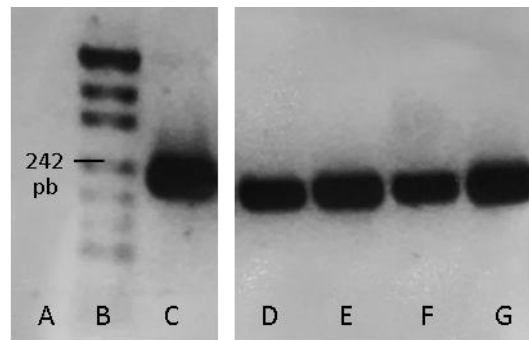


Figura 5.6. **Comparación de condiciones de Nested-PCR. BRAF-S**. Tamaño del producto: 277pb. A. Control negativo; B. MW; C. Control positivo: MEL-XX15. D y E PCR-S con 50 ng de ADN en 50 µl finales, D. Paciente 009, E. Paciente 041. F y G PCR-S (30 ng de ADN en 20 µl finales, F. Paciente 009, G. Paciente 041. Partiendo 30 ng de ADN en 20 µl, se obtuvo el mismo rendimiento que partiendo de 50 ng de ADN en 50 µl.

Para evitar la formación de producto cruzado entre los pares de primers L y S remanentes o dímero de primers, se ajustó la concentración de estos. Se disminuyó la concentración de primers-L de 0,25 µM a 0,10 µM y se aumentó la concentración de los primers-S de 0,25 µM a 0,4 µM ; con lo cual se logró la amplificación específica del producto de interés (Amplicón S). Este resultado se ilustra en las Figuras 5.7 y 5.8.

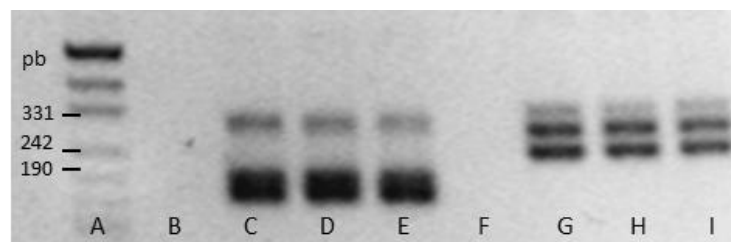


Figura 5.7. **Nested-PCR. Concentración de primers L y S 0,25 µM**. A. MW; B, C, D y E RAC1-S. Tamaño del amplicón: 163 pb. Control negativo, control positivo: MEL-XX15, pacientes 041 y 009. F, G, H, e I NRASG12/G13-S. Tamaño del amplicón: 239 pb. Control negativo, control positivo: MEL-XX15, pacientes 041 y 009. Se observan productos inespecíficos.

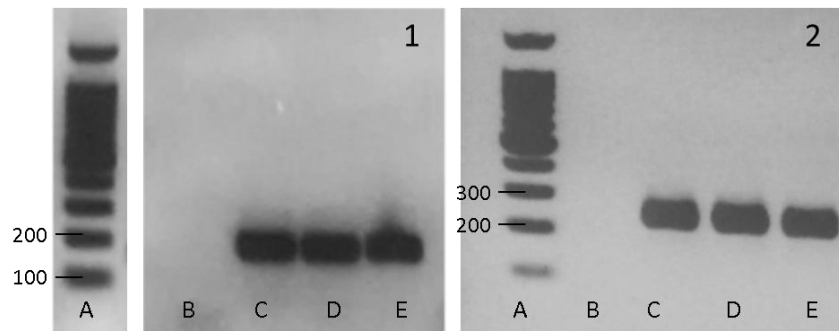


Figura 5.8. **Nested-PCR. Concentración de primers-L 0,10 μ M y primers-S 0,40 μ M. Gel 1. RAC1-S. Tamaño del amplicón: 163 pb. A. MW; B. Control negativo; C. Control positivo: MEL-XX15; D. Paciente 009; E. Paciente 041. Gel 2. NRASG12/G13-S. Tamaño del amplicón: 239 pb. A. MW. B. Control negativo; C. Control positivo: MEL-XX15; D. Pacientes 009; E. Paciente 041. Se consiguió amplificación específica.**

De esta manera se logró utilizar 3 veces menos cantidad de ADN de paciente que inicialmente y obtener una única banda del producto del tamaño esperado en cada Nested-PCRs. En la Figura 5.9 se muestran como ejemplo el resultado de la Nested-PCR del exón 8 de TP53.

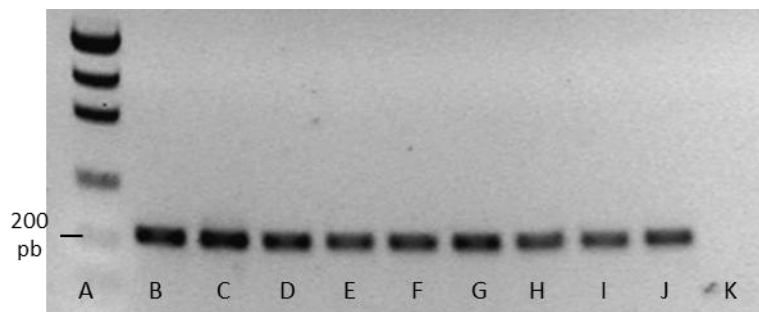


Figura 5.9. **Nested-PCR puesta a punto. TP53_8-S.**Tamaño del amplicón: 201 pb A. MW; B. Control positivo mutación: Línea HT29; C. Control positivo WT: Línea MEL-XY3; D a J. Muestras de pacientes; K. Control negativo. Ejemplo: resultado Nested-PCR TP53_8.

5.2.1.3. Puesta a punto de la amplificación del promotor TERT

El promotor de TERT tiene un porcentaje de GC mayor al 65%. Estas regiones generalmente son difíciles de amplificar ya que se producen estructuras secundarias como *hairpins* u horquillas, que pueden generar productos truncados por la terminación prematura

de la extensión de la polimerasa. También pueden generarse un apareamiento erróneo de las bases. Por ejemplo, cuando existen repeticiones de múltiples G, se genera un doblamiento inter e intrahebra debido a la formación excesiva de puentes de hidrógeno con guaninas vecinas. Como resultado de este fenómeno, las cadenas ricas en GC son difíciles de separar por completo durante la fase de desnaturalización (Frey et al. 2008).

Por esta razón, se utilizan reactivos isoestabilizantes que ayudan a que el ADN esté más accesible a la enzima, al facilitar la separación de las hebras. Algunos de estos son: glicerol, DMSO (dimetilsulfóxido) y betaina (N, N, N-trimetilglicina). El glicerol y el DMSO actúan interrumpiendo la hibridación intra e interhebra. La betaina, (análoga del aminoácido glicina) por su parte, tiene cargas positivas y negativas cerca del pH neutral, que le permiten equilibrar la T_m diferencial entre los pares AT y GC. No obstante, estos reactivos pueden disminuir o afectar la actividad de la polimerasa y su utilidad varía templado a templado (Frackman et al. 1998).

Brevemente, para la puesta a punto de la amplificación de promotor de TERT se realizaron los siguientes pasos de optimización:

En primer lugar se probó el efecto los reactivos isoestabilizantes glicerol, DMSO y betaina. A la par se evaluaron dos polimerasas de fidelidades diferentes, la GoTaq Polymerase (Promega) y la Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity, (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific) (6 veces más fiel que la GoTaq Pol).

Se comenzó trabajando con los primers TERT_promoter-S y la GoTaq Pol. Se probaron las concentraciones de DMSO 3%, 5% y 10%, y glicerol 5%, como se ve en la Figura 5.10. Aunque en ninguna condición se obtuvo un rendimiento adecuado para la posterior secuenciación, las mejores condiciones fueron 3% y 5% de DMSO.

Utilizando la polimerasa Platinum Taq Pol, se probaron las condiciones 1% y 3% de DMSO, con 20 ng o 30 ng de ADN. Como se observa en la Figura 5.10, en este caso la mejor condición fue 30 ng de ADN molde con 1% de DMSO.

Utilizando el reactivo PCR MAX 5X-PCR Enhancer (Biodynamics), el cual contiene betaína, junto con la polimerasa Platinum Taq Pol se obtuvo un mayor rendimiento de producto que en los dos casos anteriores. En esta oportunidad se usaron los primers TERT-L (Figura 5.12).



Figura 5.10. **Comparación distintos % DMSO GoTaq Pol. TERT_promoter-S**. Tamaño del amplicón: 162pb. A. Control negativo; B. 0% DMSO; C. 3% DMSO; D 5% DMSO; E. 10% DMSO; F.5% glicerol G. MW. Mejores condiciones: 3% y 5% de DMSO.



Figura 5.11. **Comparación distintos % DMSO Platinum Taq Pol. TERT_promoter-S**. Tamaño del amplicón: 162pb. A.0% DMSO, 20 ng ADN; B. 0% DMSO, 30 ng ADN; C. 1% DMSO 20 ng ADN; D. 1% DMSO, 30 ng ADN; E. 5% DMSO, 20 ng ADN; F.5% DMSO, 30 ng ADN; G. Control negativo; H. MW. Mejor condición: 30 ng de ADN molde con 1% de DMSO .

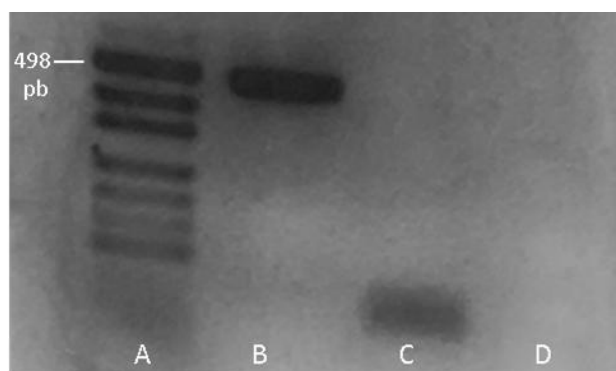


Figura 5.12. **Puesta a punto TERT_promoter-L. TERT-L**. Tamaño del amplicón 474 pb. A. MP; B.1X PCR Enhance; C. Control sin PCR *Enhancer*; D. Control negativo. Se obtuvo un mejor rendimiento que en las condiciones anteriores.

Sin embargo, al enviar a secuenciar los productos de las PCRs anteriormente detalladas, en todos las condiciones se recibieron cromatogramas que no fueron interpretables en la región a analizar, como se ilustra en la Figura 5.13.

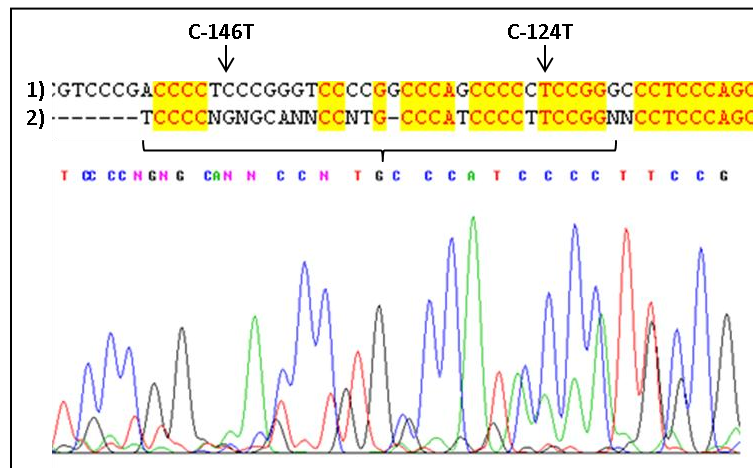


Figura 5.13. **Cromatograma y alineamiento del promotor del TERT.** Se muestra el alineamiento del amplicón TERT_promoter-S (1) y la secuencia obtenida de la secuenciación (2); y la misma región del cromatograma, donde deberían encontrarse los sitios C-146T y C-124T.

Por lo tanto, para evitar la introducción de errores durante la amplificación, se prefirió optar por una polimerasa de mayor fidelidad que las utilizadas anteriormente. Se empleó la Platinum™ Superfi™ DNA Polymerase, con el aditivo 5X Superfi GC Enhancer, que permite mejorar la actividad de la enzima en región ricas en GC. Además es una polimerasa hot start, por lo que se disminuye la aparición de productos inespecíficos y dímeros de primers.

Para la amplificación se empleó la estrategia de Touchdown-PCR (TD-PCR) que permitió aumenta la sensibilidad y especificad de la reacción al mismo tiempo. La TD-PCR consiste en comenzar con una T_{ann} aproximadamente 10°C superior a la estimada para el par de primers utilizado, y luego descenderla 1°C por ciclo, durante 12-15 ciclos, hasta llegar a la T_{ann} estimada o entre 2 a 5°C por debajo. De este modo en los primeros ciclos se produce una amplificación muy específica; y luego en los ciclos con T_{ann} más baja estos amplicones actuarán como molde permitiendo una gran productividad, sin perder la especificidad (Korbie and Mattick 2008). Este programa se utilizó tanto en las PCR-S como en la PCR-L.

En la Figura 5.14 se muestra el resultado de la Nested-PCR de TERT, utilizando esta metodología, con la cual se logró obtener finalmente cromatogramas de buena calidad (Figura 5.15).

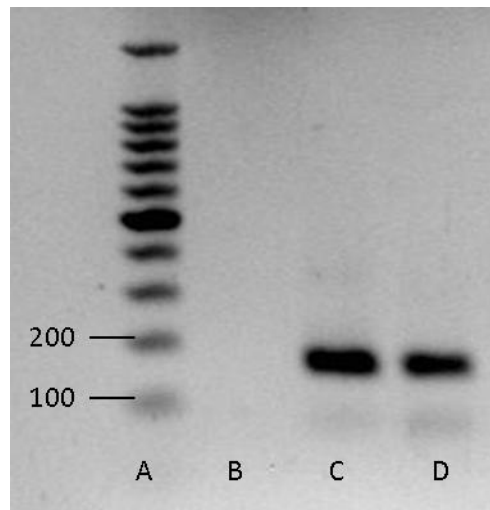


Figura 5.14. **Nested-PCR TERT con TD-PCR y Platinum Superfi Taq.** TERT_promoter-S. Tamaño del amplicón: 163 pb. A. MP; B. Control negativo; C. Control positivo (MEL-XX15); D. Paciente 009. Condición final.

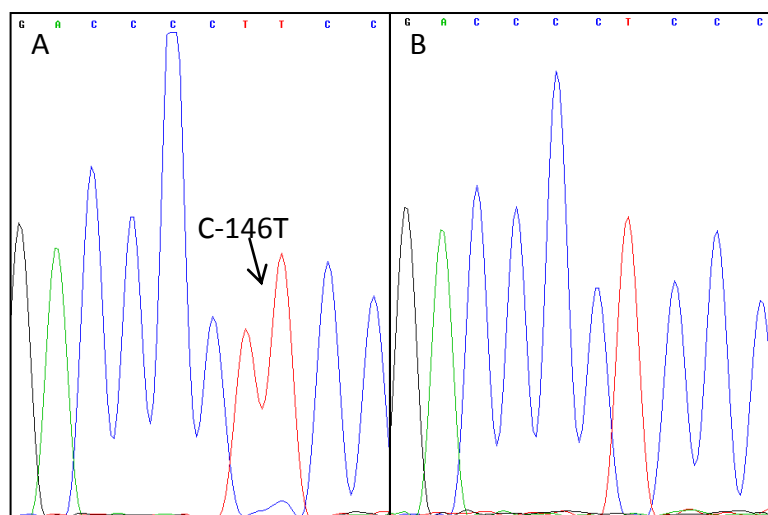


Figura 5.15. **Cromatogramas Nested-PCR TERT, con Platinum Superfi Pol y TD-PCR.** A. Línea MEL -XX15 TERT^{C-146T; C-124T} B. Paciente 009 TERT^{WT}. Condición final.

5.2.2. Determinación de mutaciones frecuentes en MCH por Nested-PCR y posterior secuenciación

5.2.2.1. Estatus mutacional del oncogén BRAF exón 15.

Para la amplificación y posterior secuenciación del exón 15 de BRAF se utilizaron los pares de primers cuya ubicación se muestran en la Figura 5.16, que permiten analizar las mutaciones V600 y K601 frecuentes en MCH.

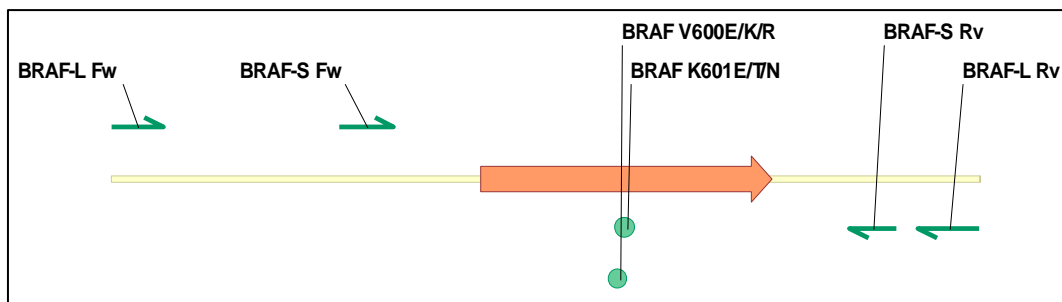


Figura 5.16. **Región analizada del gen BRAF.** Esquema de la posición de los primers BRAF-L (354pb) y BRAF-S (277 pb) y los *hot spot* mutacionales V600 y K601 (se indican las sustituciones más frecuentes), en el exón 15 de BRAF.

Se encontró que 67% (8/12) de las biopsias contenían una mutación puntal en el exón 15 del oncogén BRAF, siendo todas ellas V600E heterocigota (cambio de valina por ácido glutámico en la posición 600). En cuanto al cambio de secuencia a nivel nucleotídico, en todos los casos ocurrió una sustitución de T>A en la posición 1799 (Figura 5.17). Los pacientes que sufrieron estas alteraciones fueron: 009, 012, 028 y 042 pertenecientes al grupo de pacientes progresados, 005, 024,022 y 045, pertenecientes al grupo de pacientes libres enfermedad a distancia.

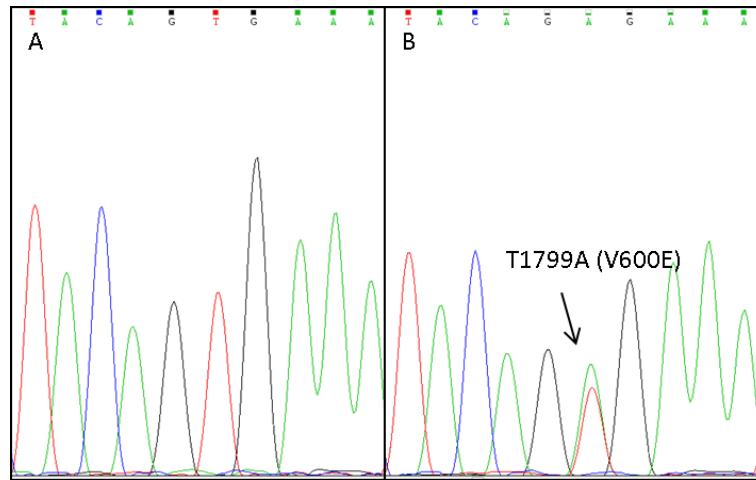


Figura 5.17. **Cromatogramas Fw del exón 15 de BRAF.** A. Paciente 021, BRAF^{WT}. B. Paciente 045, BRAF^{V600E} heterocigota.

5.2.2.2. Estatus mutacional del oncogén NRAS exones 2 y 3

Para analizar los sitios de mutación frecuente en MCH NRAS G12/G13 y NRAS Q61, las cuales se encuentran en dos exones distintos del gen, se amplificó cada exón por separado. La ubicación de los primers utilizados se muestra en la Figura 5.18.

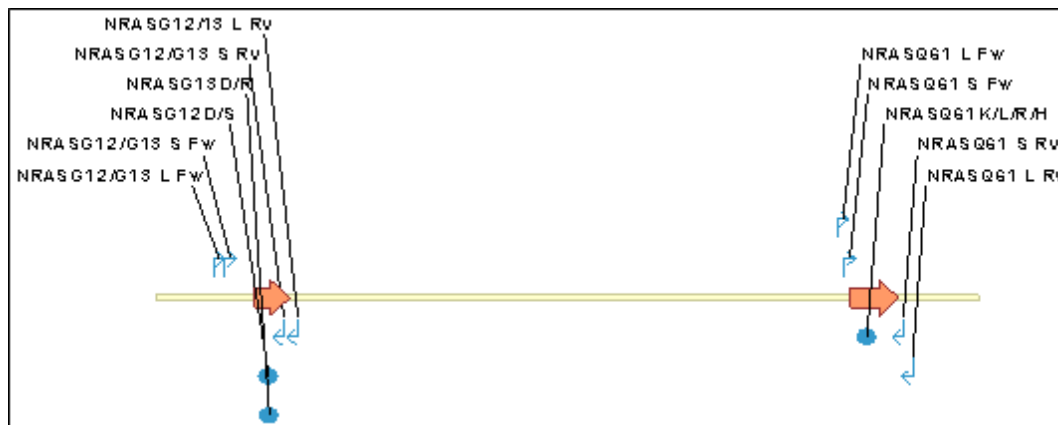


Figura 5.18. **Región analizada del gen NRAS.** Esquema de la ubicación de los primers NRASG12/G13 L (332 pb) y S (239 pb) ubicados en el exón 2; NRASQ61 L (299 pb) y S (243 pb) ubicados en el exón 3; y las mutaciones que permiten analizar (se indican las sustituciones más frecuentes). Se muestra un fragmento de 3037 pb del gen NRAS, que comprende los exones 2 y 3.

En solo una biopsia, se vieron mutaciones en el oncogén NRAS. En esta se encontraron las alteraciones Q61R heterocigota (cambio de glutamina por arginina), producido por sustitución de A>T en la posición 182, y G12D heterocigota (glicina por aspartato), dado por el cambio a nivel nucleotídico G>A en la posición 35. Ambas se ilustran en la Figura 5.19. Esta biopsia pertenecía al paciente 021, que se encuentra en el grupo libre de enfermedad a distancia.

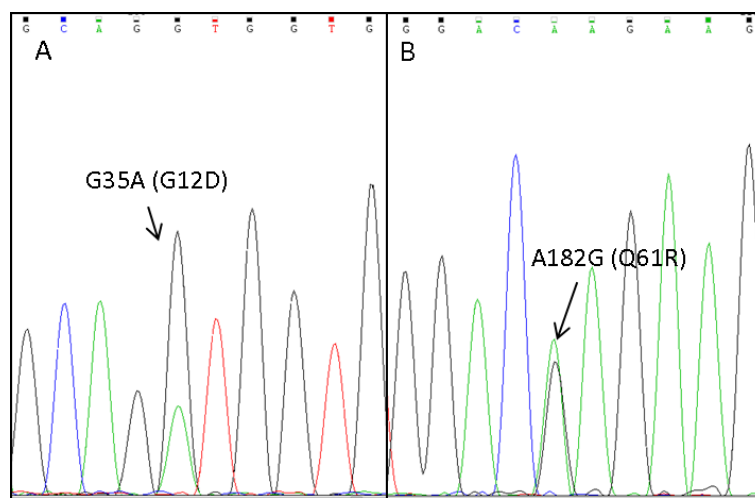


Figura 5.19. **Cromatogramas Fw de NRAS.** A. Paciente 021, NRAS^{G12D} heterocigota. B. Pacientes 021, NRAS^{Q61R} heterocigota.

5.2.2.3. Estatus mutacional del oncogén RAC1 exón 2

En el exón 2 del oncogén RAC1 se encuentra la mutación frecuente P29S (cambio de prolina por serina), la cual surge de la sustitución C>T en la posición 85. Para su análisis se emplearon los pares de primers RAC1-L y RAC1-S, cuya ubicación se muestra en la Figura 5.20. No obstante, en las biopsias analizadas no fue encontrada dicha mutación (Figura 5.21). Todos los pacientes fueron RAC1^{WT}.

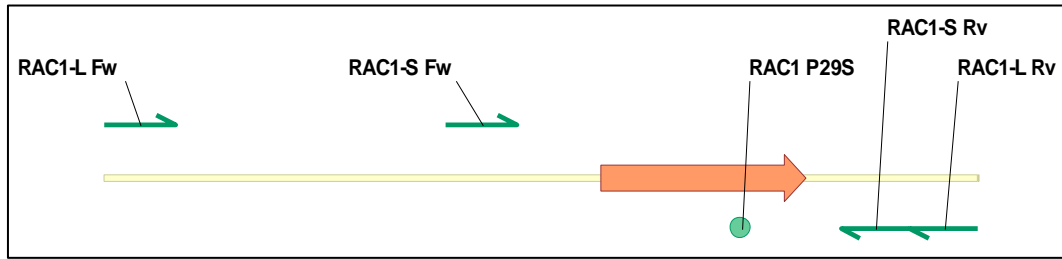


Figura 5.20. **Región analizada del gen RAC1.** Esquema de la ubicación de los primers RAC1-L (307 pb), RAC1-S (163 pb) y la mutación puntual RAC1^{P29S} frecuente en MCH en el exón 2 del gen RAC1.

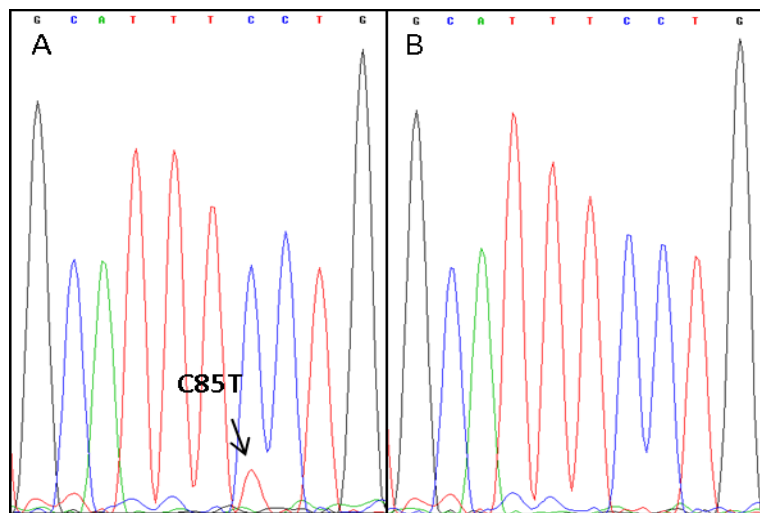


Figura 5.21. **Cromatogramas RAC1.** A. Línea MEL-XX15 con la mutación RAC1^{P29S}. B. Paciente 025 RAC1^{WT}.

5.2.2.4. Estatus mutacional del gen supresor de tumor TP53

Se analizaron los exones 5, 6, 7 y 8 del gen supresor de tumor TP53, en el cual se observan mutaciones recurrentes en MCH. Para ello se utilizaron los ocho pares de primers que se muestran en la Figura 4.22.

Se observó que 33% (4/12) de los tumores contenía alguna mutación puntual en el gen TP53. Las mutaciones halladas fueron: en el exón 6, E204K homocigota (cambio de ácido glutámico por lisina), la cual surge por una sustitución de G>A en la posición 610. El resto de las mutaciones se encontraron en el exón 8, F270S heterocigota (sustitución de fenilalanina por serina), dado por el cambio C>T en la posición 809; R290H heterocigota

(cambio de arginina a histidina), debido al cambio nucleótido G>A en la posición 869; y finalmente la mutación S303G heterocigota, generada por la variación A>G a nivel nucleotídico en la posición 907 (Figura 5.23).

Las cuatro mutaciones se hallaron reportadas en base de datos COSMIC. La mutación F270S, se reporta como “patogénica”; las mutaciones R290H y E204K como “neutrales”; y en la mutación S303G no constaba esta información (Forbes et al. 2009). Esta clasificación surge de modelos *in silico* que comparan la estructura proteica, no de validaciones biológicas. De todos modos, estas alteraciones están dentro del dominio de unión al ADN de p53, esencial para su función supresora de tumor (Stengel et al. 2014).

Los pacientes 041 y 042 que presentaron las mutaciones F270S y R290H, pertenecían al grupo de pacientes progresados; mientras que los pacientes 005 y 025 que tuvieron las mutaciones E204K y S303G respectivamente pertenecían al grupo libre de enfermedad a distancia.

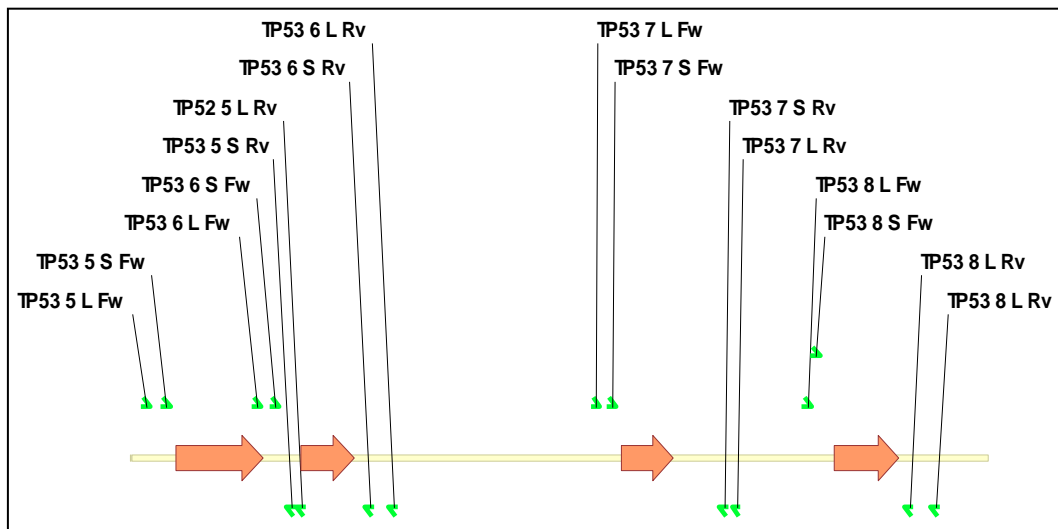


Figura 5.22. **Región analizada del gen TP53.** Esquema de la ubicación de los primers TP53: Exón 5: TP53_5-L (351 pb) y TP53_5-S (287 pb). Exón 6: TP53_6-L (311 pb) y TP53_6-S (223 pb). Exón 7: TP53_7-L (318 pb) y TP53_7-S (258 pb). Exón 8: TP53_8-L (393 pb) y TP53_8-S (219 pb). Las mutaciones pueden encontrarse a lo largo de la región codificante. Se muestra un fragmento del gen TP53 de 1820 pb.

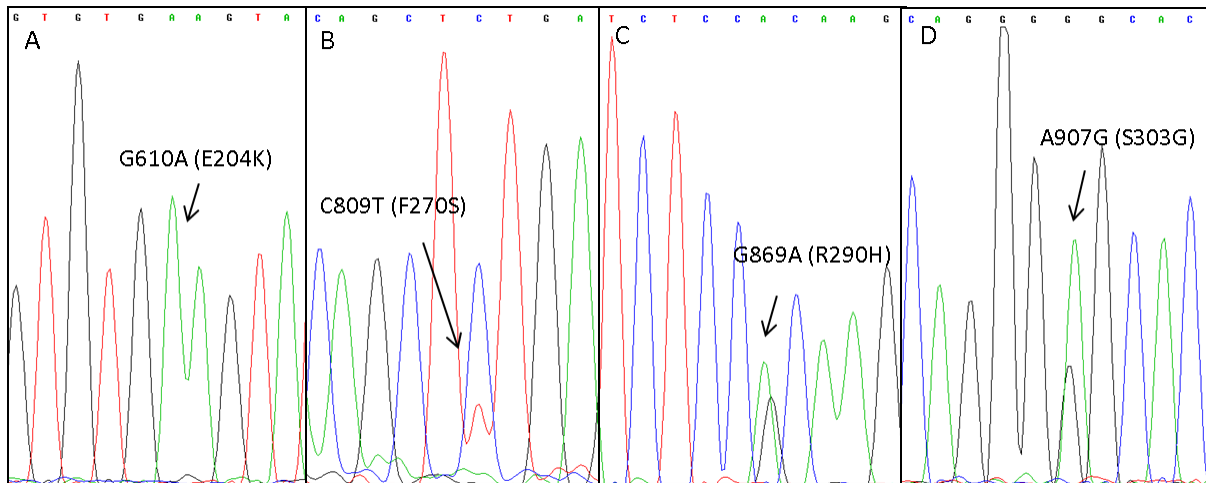


Figura 5.23. **Cromatogramas Fw de TP53.** A. Paciente 005. B. Paciente 041. C. Paciente 042. D. Paciente 025.

5.2.2.5. Estatus mutacional del gen supresor de tumor PTEN

Se analizó el exón 5 del gen supresor de tumor PTEN mediante los primers PTEN_5-L y PTEN_5-S cuya ubicación se muestra en la Figura 5.24, ya que alberga el 33% de las mutaciones que ocurren en este gen.

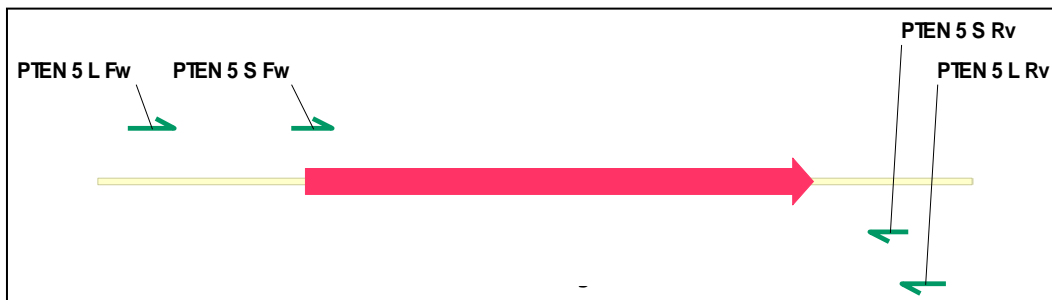


Figura 5.24. **Región analizada del gen PTEN.** Esquema de la ubicación de los primers PTEN_5-L (395 pb) y PTEN_5-S (290 pb) respecto al exón 5 de PTEN. Las mutaciones se pueden encontrar a lo largo del exón.

En dos pacientes se hallaron mutaciones en el exón 5 de PTEN. Las mutaciones encontradas fueron: en el paciente 005 D162N homocigota (cambio de aspartato por asparagina) debida a una sustitución de G>A en la posición 484; y L112I heterocigota (sustitución de leucina por isoleucina) producida por un cambio C>A a nivel nucleótido en la posición 334, en el paciente 021 (Figura 5.25). Ninguna de las dos se encuentra reportadas en

COSMIC, aunque si otros cambios aminoacídicos en la misma posición, L112V/P/Q y D162V/G, que se clasifican como “patogénicos”. Por lo que las mutaciones halladas podrían tener un efecto similar (Forbes et al. 2009). Además, estas mutaciones caen dentro del dominio fosfatasa de Pten, al que se adjudica la función supresora de tumor (Aguissa-Touré and Li 2012). Ambos pacientes se encontraban en el grupo libre de metástasis a distancia.

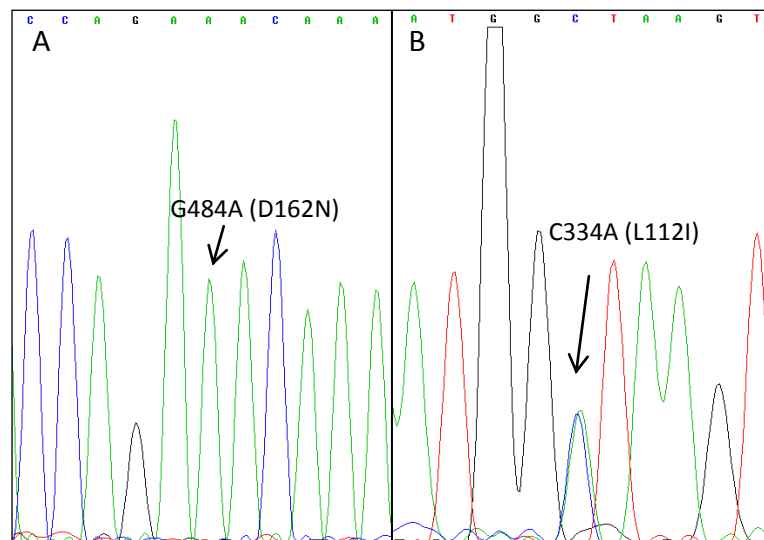


Figura 5.25. **Cromatogramas Fw del exón 5 de PTEN.** A. Paciente 005 PTEN^{D162N} homocigota. B. Paciente 021 PTEN^{L112I} heterocigota.

5.2.2.6. Estatus mutacional del gen supresor de tumor CDKN2A

Para analizar las mutaciones frecuentes ocurridas en el gen supresor de tumor CDKN2A, se diseñaron los primers CDKN2A_1 α -L y S y CDKN2A_2-L y S, que amplifican los exones 1 α y 2 respectivamente (Figura 5.26).

En tres pacientes se hallaron mutaciones en CDKN2A. El paciente 012 presentó la mutación V51L heterocigota (sustitución de valina por leucina), dada por el cambio G>T en la posición 151 de la variante transcripcional 1, isoforma p16^{INK4A}. Esta mutación no se encuentra en COSMIC, pero si las mutaciones V51I/P/D, las cuales se informan como “patogénicas”, por lo que la mutación hallada también podría serlo (Forbes et al. 2009).

En el paciente 045 se observó una transición C>T en la posición 109 del exón 2 que provocó en un cambio *missense* tanto p16^{INK4A} como p14^{ARF}. En p16^{INK4A} se vio el

cambio R87W heterocigota (cambio de arginina por triptófano), dado por la alteración de la posición 259 de transcripto 1. En p14^{ARF}, el cambio de la posición 302 del transcripto 4 resultó en la mutación P101I (prolina por isoleucina). La mutación R87W, se reporta en COSMIC como “patogénica”, mientras que P101I, no se halló de la base de datos (Forbes et al. 2009).

Además, en el paciente 041, se encontró la mutación *nonsense* W66* homocigota (cambio de triptófano por el codón stop TGA), generado por la sustitución de G>A en la posición 198 del transcripto 3, isoforma p12 (Figura 5.27). Esta isoforma es una variante de p16^{INK4A}, que surge del uso de un sitio de *splicing* alternativo en el intrón 1, con lo cual está compuesta por el exón 1α y una parte del intrón 1 que deriva el C-terminal de la proteína. Sin embargo, no está probado que esta isoforma se relacione con MCH, por lo que no será tomada en cuenta en análisis posteriores (Robertson and Jones 1999; Zhang et al. 2010).

El paciente 045, se encontraba en grupo libre de metástasis a distancia, 041 y 012 en grupo de pacientes progresados.



Figura 5.26. **Región analizada del gen CDKN2A.** Esquema de la ubicación de los primers CDKN2A_1α-L (527 pb), CDKN2A_1α-S (340 pb), CDKN2A_2-L (432 pb) y CDKN2A_2-S (348pb). Se indica la posición del codón de inicio (ATG) de los transcritos de p16^{INK4A} y p12. Se muestra una sección de CDKN2A de 4980pb.

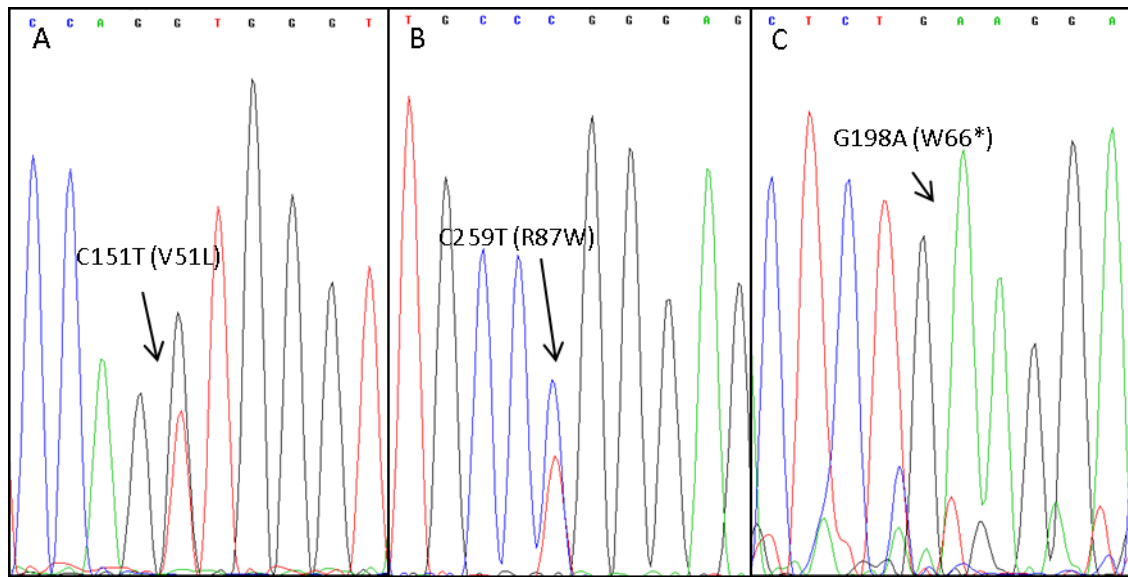


Figura 5.27. **Cromatogramas Fw de CDKN2A.** A. Paciente 012 p16^{V51L} p14^{P101I}. B. Paciente 045 p16^{R87W}. C. Paciente 041 p12^{W66*}.

5.2.2.7. Estatus mutacional del promotor de TERT

Para analizar las mutaciones frecuentes C-146T y C-124T se utilizaron los primers TERT_promoter-L y TERT_promoter-S, que permiten analizar el promotor de TERT entre las posiciones -48 pb y -208pb (Figura 5.28). Dado que el promotor de TERT tiene una secuencia con alto contenido de GC (>65%), lo cual lo convierte en un templado difícil para su amplificación y posterior secuenciación, el análisis de su estatus mutacional pudo ser completado en 7 pacientes.

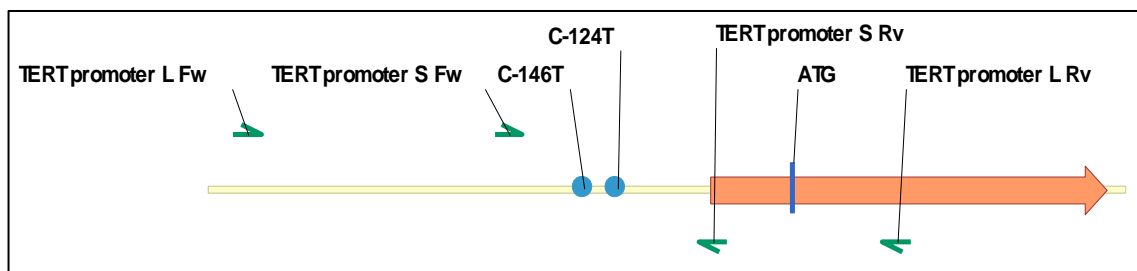


Figura 5.28. **Región analizada de TERT.** Esquema de la ubicación de los primers TERT_promoter-L (474 pb), TERT_promoter-S (162pb) y los *hot spot* C-124T y C-146T con respecto al codón de inicio (ATG). Se muestran 510 pb comprendidas entre la posición -408 y 102 del gen TERT.

Estas mutaciones generan la secuencia consenso 5'-CCCCTTCCGGG-3' que contiene el sitio de unión para factores de transcripción de la familia Ets-TCF (Huang et al. 2013). La mutación homocigota C-146T se encontró únicamente en el paciente 012, perteneciente al grupo de pacientes progresados (Figura 5.29).

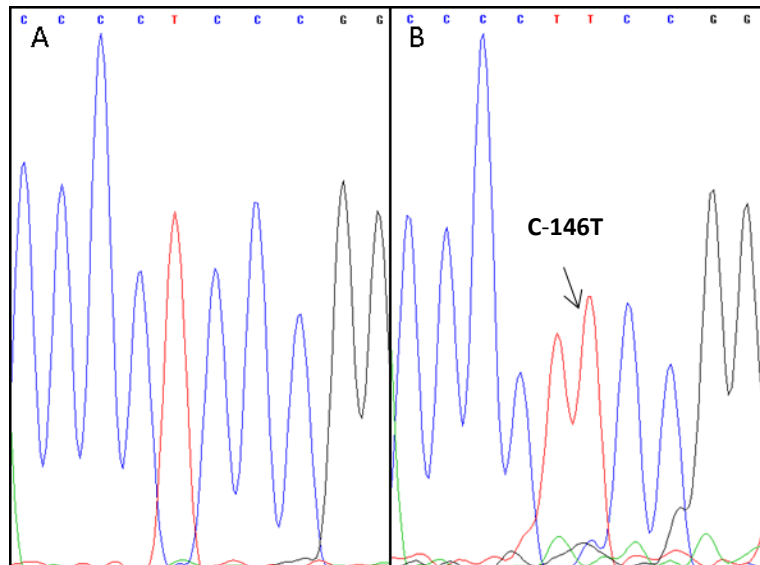


Figura 5.29. Cromatogramas Fw del promotor de TERT. A. Paciente 025 Tert^{WT}. B. Paciente 012 TERT^{C-146T}.

5.2.3. Análisis del número de copias de los genes PTEN y CDKN2A en biopsias de pacientes por Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

El análisis de la variación del número de copias de los genes PTEN y CDKN2A, se realizó por FISH. Para esto se utilizaron las sondas optimizadas para tejido incluido en FFPE *ZytoLight® SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe* y *SPEC CDKN2A/CEN 9 Dual Color Probe*, respectivamente. Ambas contienen una mezcla de dos sondas, una específica para el ADN alfa satelital del centrómero del cromosoma (marcado con un fluoróforo naranja) y otra específica para la región del cromosoma que contiene el gen en estudio (marcado con un fluoróforo verde). En la Figura 5.30 se muestra un caso representativo de cómo se ven las sondas con los tres filtros utilizados, y luego el *merge* de los tres canales en el microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX53).

FISH PTEN

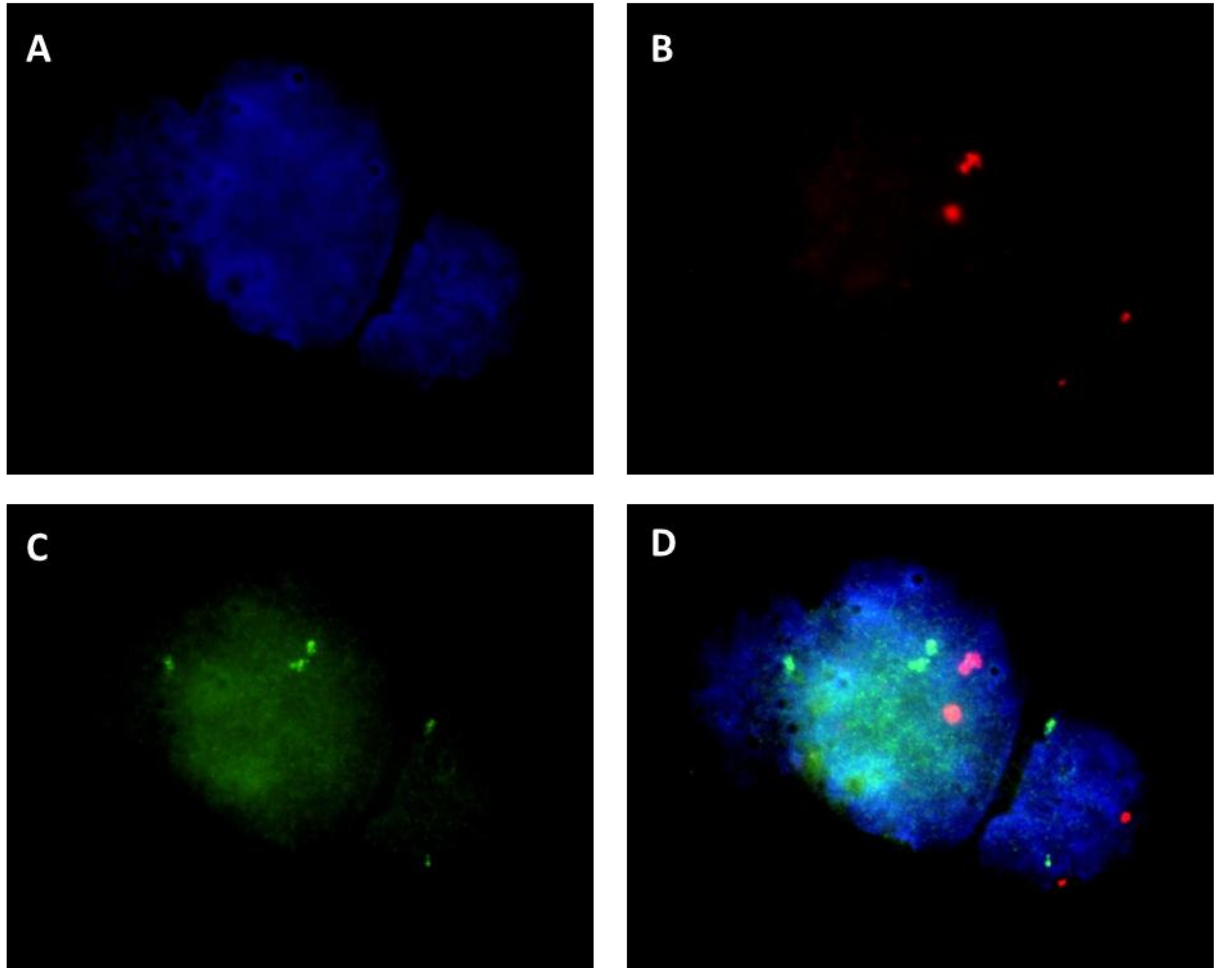


Figura 5.30. **FISH sonda específica para PTEN. Línea MEL-XY2 (PTEN WT).** Aumento original 1000X. A. Núcleos (DAPI); B. Centrómeros cromosoma 10 (rojo); C. Sonda para PTEN (verde); D. *Merge* de las tres fotos anteriores.

Para determinar si los tumores presentaban delección de PTEN o CDKN2A, se contó (mediante el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX53) cada población de células, y se consideró que el número de copias estaba alterado cuando las poblaciones de células delecionadas superaba el 30% de las totales, tal como se detalla en la sección 4.2.5.2 de Metodología.

La posible delección del gen PTEN se analizó en los 3 pacientes de los que no se había logrado amplificar el exón 5 de este gen por Nested-PCR. Todas las biopsias

mostraron una gran heterogeneidad en cuanto a la cantidad de copias de este gen. Es decir, se encontraron células con delección hemicigota u homocigota de PTEN, y células con delección completa del cromosoma 10.

El mayor porcentaje de células delecionadas se vio en el paciente 003, en el cual el 67% de las células presentaban un número reducido de copias de PTEN (Figura 5.31). En este paciente las poblaciones de células predominantes fueron: células normales, células con delección hemicigota de PTEN y células con un cromosoma 10 delecionado completo y en el otro PTEN delecionado. Las poblaciones con diferentes alteraciones genéticas en cuanto a PTEN se detallan en la TABLA XIV.

En los pacientes 022 y 042 las poblaciones celulares predominantes fueron: células normales y células con una delección completa de un cromosoma 10. El porcentaje total de células delecionadas fue 58% y 38% respectivamente (TABLA XIV) (Figura 5.31).

Dos de estos pacientes se encuentra en el grupo de pacientes progresados y otro en el grupo de pacientes libres de metástasis a distancia.

TABLA XIV. Estudio del número de copias de PTEN por FISH. Poblaciones celulares encontradas en las biopsias tumorales analizadas. Se muestra el número de células de cada población contadas en número absoluto y porcentaje.

Poblaciones celulares ‡	PTEN					
	Pacientes					
	003		022		042	
	Nº abs.	Porcentaje	Nº abs.	Porcentaje	Nº abs.	Porcentaje
2;0	1	1,5%	1	1,3%	0	0,0%
2;2	19	28,4%	27	34,2%	20	47,6%
2;1	16	23,9%	10	12,7%	4	9,5%
1;1	11	16,4%	23	29,1%	16	38,1%
1;0	17	25,4%	12	15,2%	0	0,0%
Otros	3	4,5%	6	7,6%	2	4,8%
Total	67	100,0%	79	100,0%	42	100,0%

‡ 2;0 y 1;0 delección homocigota; 2;1 y 1;1 delección hemicigota 2;2 PTEN bialélico; otros: Cromosoma 10 poliploides.

FISH PTEN

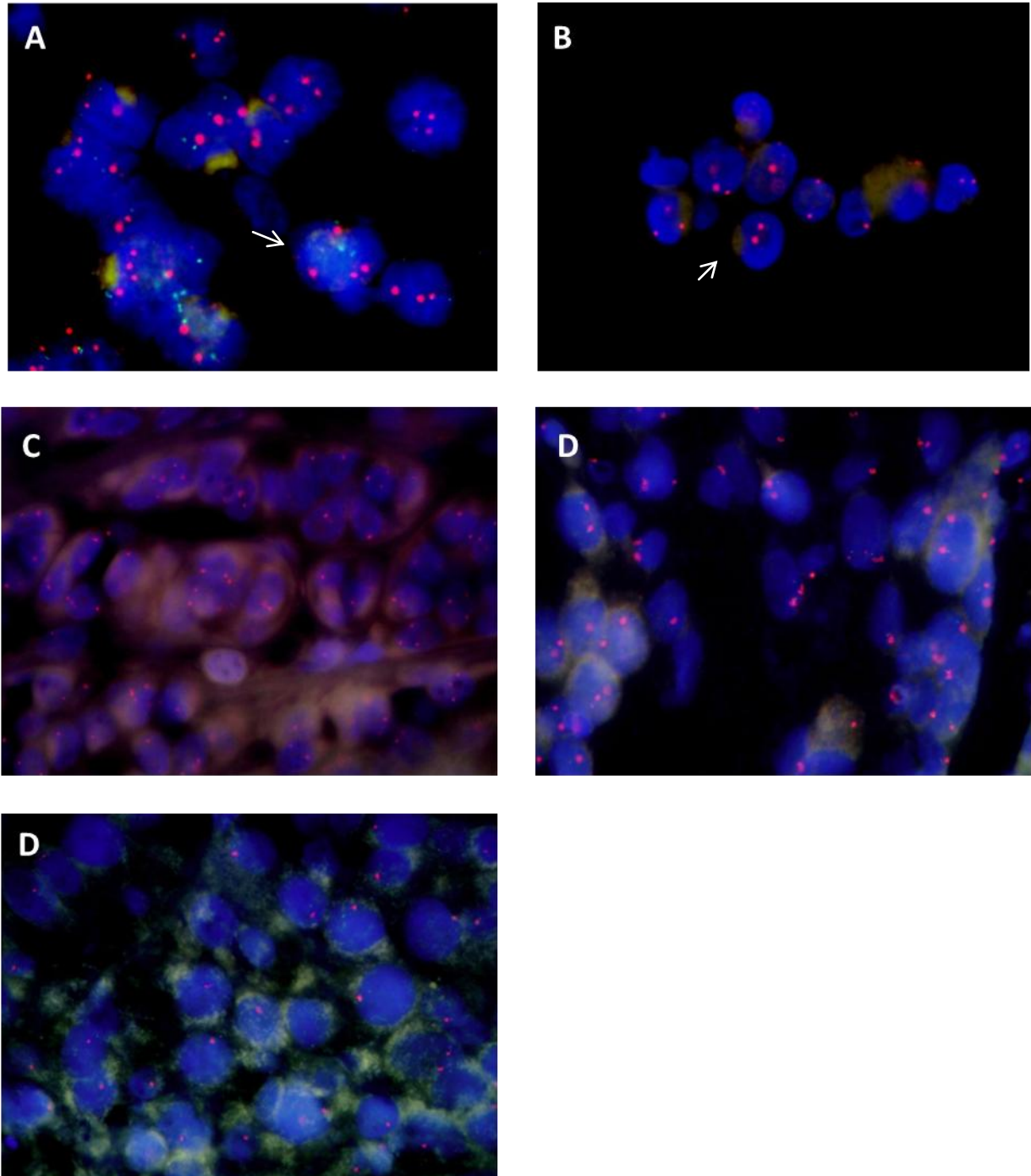


Figura 5.31. **Evaluación del número de copias de PTEN FISH.** Sonda específica para PTEN, (fluoróforo verde), centrómero cromosoma 10, (fluoróforo rojo). Aumento original

1000X. A. Control positivo de hibridación: MEL-XY2; B. Control positivo deleción: MEL-XY3 C. Paciente 003; D. Paciente 022; D. Paciente 042.

El estudio del número de copias del gen supresor de tumor CDKN2A, se llevó a cabo en las dos biopsias de paciente que por Nested-PCR no se había podido amplificar ni el exón 1α, ni el 2 de este gen.

Al igual que en PTEN, se encontró una gran heterogeneidad tumoral en el número de copias de este gen a lo largo de las células analizadas. Las dos biopsias estudiadas mostraron deleción del gen en alto porcentaje de células. En la biopsia del paciente 003, se encontró que el 83% de las células tumorales tenían algún tipo de deleción de CDKN2A (Figura 5.32). En este tumor predominó la población de células con deleción homocigota del gen. En la biopsia del paciente 005, predominó la misma población celular, y el porcentaje total de células con algún tipo de deleción de CDKN2A fue el 79% (Figura 5.31). En la TABLA XV se detallan las poblaciones celulares con respecto al número de copias de CDKN2A.

Uno de los pacientes pertenecía al grupo de pacientes libres de enfermedad y el otro al grupo de pacientes progresados.

TABLA XV. Estudio del número de copias de CDKN2A por FISH. Poblaciones celulares encontradas en las biopsias tumorales analizadas. Se muestra el número de células de cada población contadas en número absoluto y porcentaje.

CDKN2A				
Pacientes				
Poblaciones celulares	003		005	
	Nº abs.	Porcentaje	Nº abs.	Porcentaje
2;0	4	11,1%	6	8,3%
2;2	6	16,7%	15	20,8%
2;1	16	44,4%	27	37,5%
1;1	5	13,9%	15	20,8%
1;0	5	13,9%	9	12,5%
Total	36	100,0%	72	100,0%

‡ 2;0 y 1;0 deleción homocigota; 2;1 y 1;1 deleción hemocigota 2;2 CDKN2A bialélico;

otros: Cromosoma 10 poliploides.

FISH CDKN2A

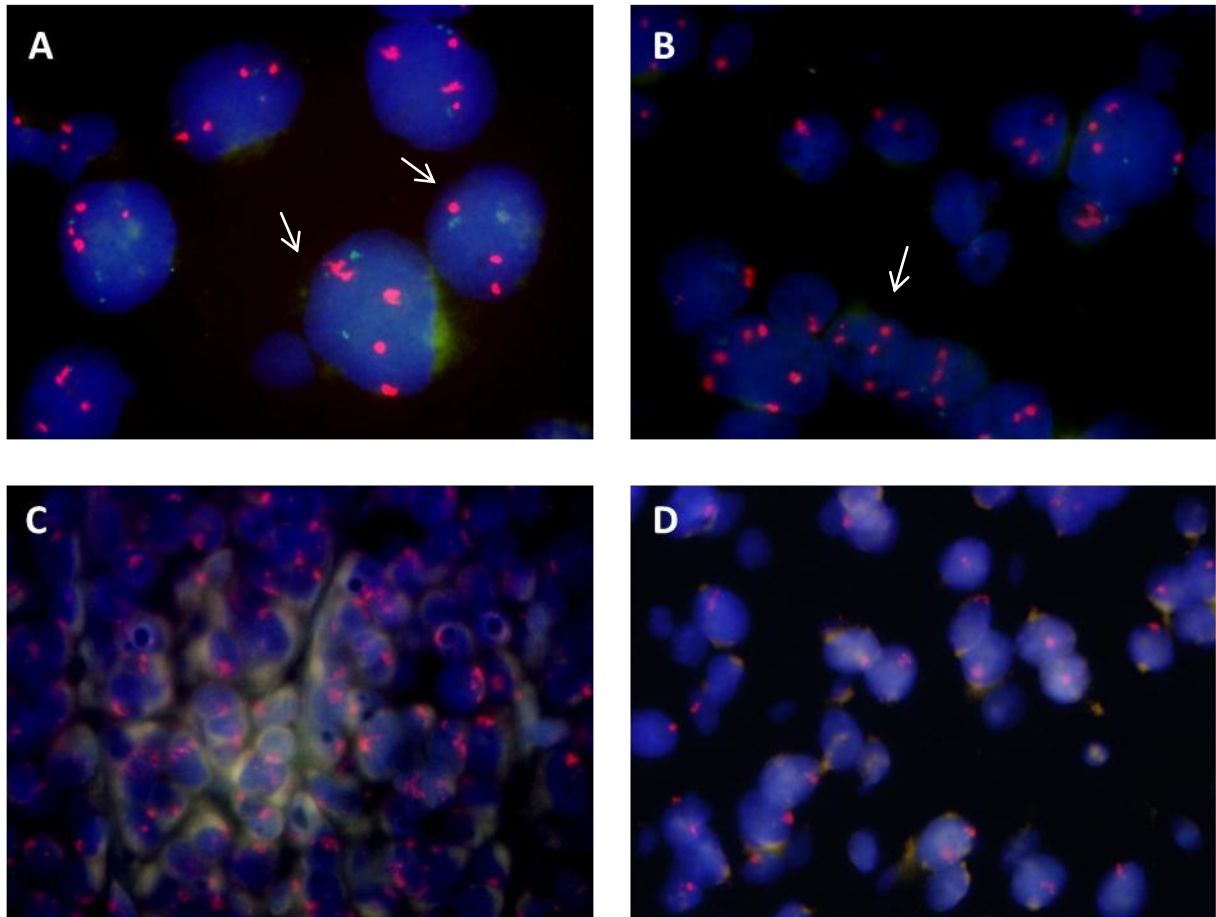


Figura 5.32. **Evaluación del número de copias CDKN2A por FISH.** Sonda específica para CDKN2A, (fluoróforo verde), centrómero cromosoma 9, (fluoróforo rojo). Aumento original 1000X. A. Control positivo de hibridación: MEL-XY3; B. Control positivo deleción: MEL-XX4; C. Paciente 003. D. Paciente 005.

5.3. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE ALTERACIONES GENÉTICAS

5.3.1. Coexistencia de mutaciones y relación con la evolución clínica

De los ocho pacientes que sufrieron mutaciones en **BRAF** (67%), cuatro pertenecían al grupo de pacientes libres de metástasis a distancia (n=6) y los otros cuatro al grupo de pacientes progresados (n=6). No se encontró diferencia en cuanto a las curvas de

sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS) entre los pacientes BRAF^{V600E} y BRAF^{WT} ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.33).

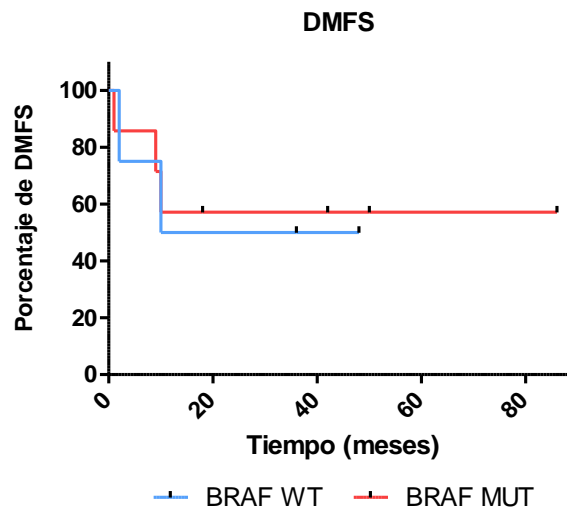


Figura 5.33. **Sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS)**. Pacientes BRAF^{V600E} (rojo); pacientes BRAF^{WT} (azul) ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

Estas mutaciones coexistieron con alteraciones en otros genes. CDKN2A fue el principal gen alterado en las biopsias BRAF^{V600E}, en tres de los ocho casos. En dos biopsias se vieron alteraciones en PTEN y TP53 al mismo tiempo que en BRAF. Además, en una biopsia se observó una mutación en el promotor de TERT junto con BRAF, y en tres biopsias BRAF^{V600E} fue la única alteración encontrada entre los genes analizados. Esto se ilustra en la Figura 5.37.

El único paciente con un tumor con mutaciones en **NRAS** (NRAS^{G12D, Q61R}), además presentó una mutación en el dominio fosfatasa de Pten y pertenecía al grupo de pacientes libres de enfermedad (Figura 5.37).

De los cuatro pacientes con mutaciones en **TP53** (33%), dos pertenecía al grupo de pacientes libres de metástasis a distancia y dos al grupo de pacientes progresados. Sin embargo, se observó diferencia en cuanto a las curvas de DMFS de los pacientes con y sin alteraciones en este gen, aunque la diferencia no fue significativa ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.34). Dos pacientes con tumores con TP53 mutado, además contenían alteraciones en los genes BRAF y PTEN, mientras que en los otros dos TP53 fue el único gen mutado entre los analizados (Figura 5.37).

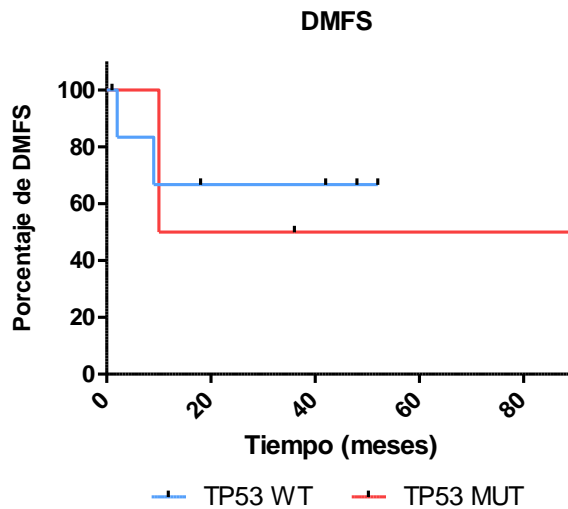


Figura 5.34. **Sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS).** Pacientes TP53^{MUT} (rojo), pacientes TP53^{WT} (azul) ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

En el 42% (5/12) de las biopsias se encontró pérdida de función (LoF) de gen **PTEN**. Fue la segunda alteración más frecuente luego de BRAF. Estas mutaciones coexistieron con alteraciones en otros genes. Dos pacientes tuvieron alguna alteración en PTEN junto la vez en BRAF y TP53, y un pacientes tuvo delección de PTEN y CDKN2A al mismo tiempo. Además, en un paciente la alteración en PTEN coexistió únicamente con NRAS mutado y en otro con BRAF mutado. Esto se ilustra en la Figura 5.37.

Los pacientes con PTEN mutado, tuvieron una mayor DMFS que los pacientes PTEN^{WT}, ambos se encontraban en el grupo de pacientes libres de metástasis a distancia. En cambio, los pacientes con delección de PTEN, presentaron una DMFS menor que los PTEN^{WT} uno de los pacientes se encontraba en el grupo de pacientes libres de metástasis a distancia y el otro en el grupo de pacientes progresados) ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.35).

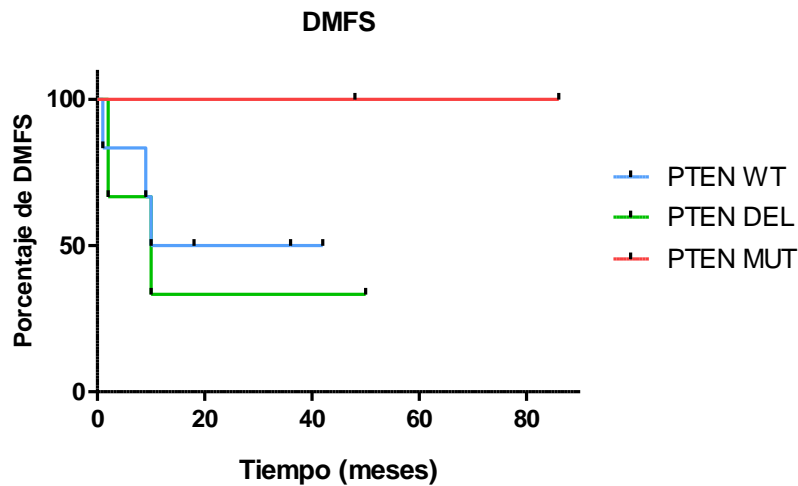


Figura 5.35. **Sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS).** Pacientes PTEN^{MUT} (rojo), pacientes PTEN^{WT} (azul) y pacientes PTEN^{DEL} (verde) ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

De los cuatro pacientes con alteraciones en **CDKN2A** (33%), dos se ellos se encontraban en el grupo de pacientes libres de metástasis a distancia y los otros dos en el grupo de pacientes progresados. Sin embargo, el grupo de pacientes con alteraciones en CDKN2A tuvo peor DMFS con respecto al grupo CDKN2A^{WT}, aunque no fue significativa ($p > 0,05$ test de Wilcoxon) (Figura 5.36).

En tres de los cuatro pacientes con CDKN2A alterado también se vio BRAF^{V600E}. Además, los pacientes con LoF de CDKN2A, también tuvieron alteraciones genéticas en PTEN, TP53 y TERT (Figura 5.37).

El único paciente en el que se encontró una mutación el promotor de **TERT**, también presentó mutaciones *missense* en BRAF y CDKN2A. Se encontraba en el grupo de pacientes progresados (Figura 5.37).

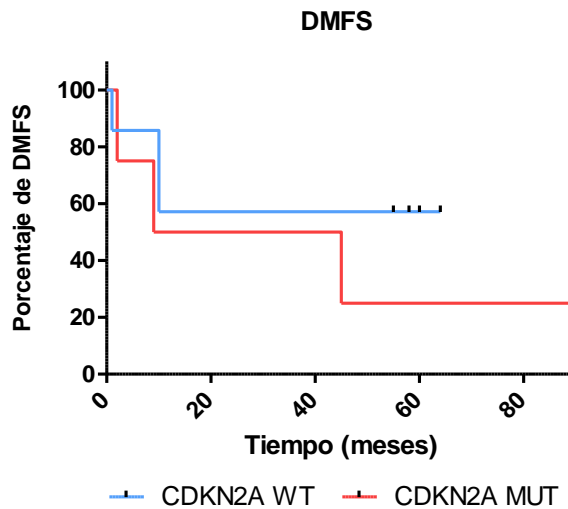


Figura 5.36. **Sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS).** Pacientes CDKN2A^{MUT} (con mutaciones puntuales o deleciones) (rojo), pacientes CDKN2A^{WT} (azul) ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

5.3.2. Resumen de las mutaciones halladas por grupo

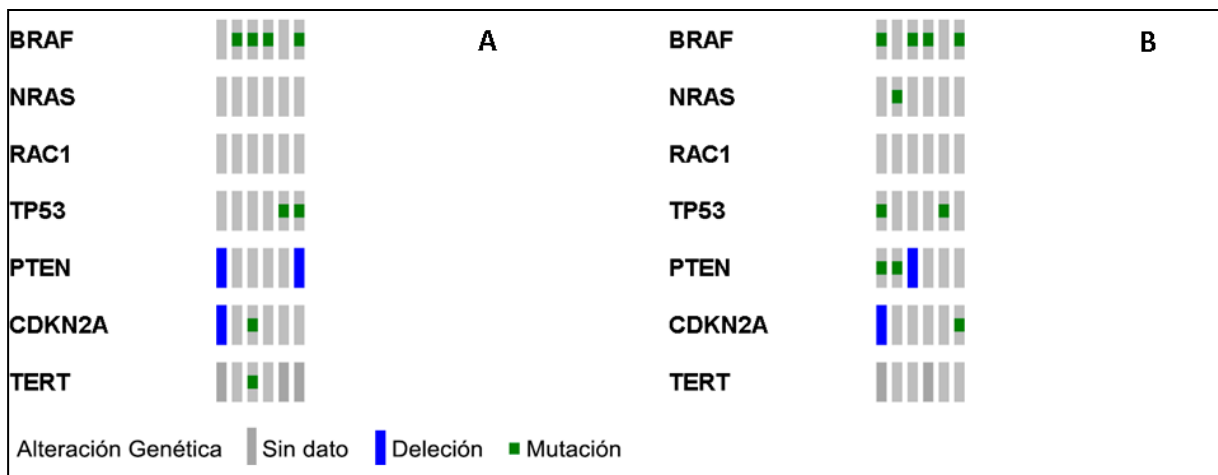


Figura 5.37. **Oncoprint.** Se representan las mutaciones y deleciones halladas por Nested PCR o FISH **A.** Grupo A . Pacientes progresados (n=6); **B.** Grupo B. Pacientes libres de enfermedad a distancia (n=6).

5.3.3. Análisis integral del perfil de alteraciones genéticas y su relación con la evolución de la enfermedad

Para relacionar todas las variables analizadas en este estudio, con el fin de hallar alguna asociación multivariada que pueda correlacionar con la evolución de los pacientes, se efectuó un Análisis de Componentes Principales descriptivo a partir del cual se construyeron gráficos de dispersión Biplot. Estos permiten visualizar las observaciones y variables en un mismo espacio, para identificar asociaciones entre observaciones, entre variables, y entre variables y observaciones. El promotor de TERT no pudo tenerse en cuenta en este análisis porque hay pacientes en los que no se pudo analizar. Estos gráficos se muestran en las Figuras 5.38 y 5.39.

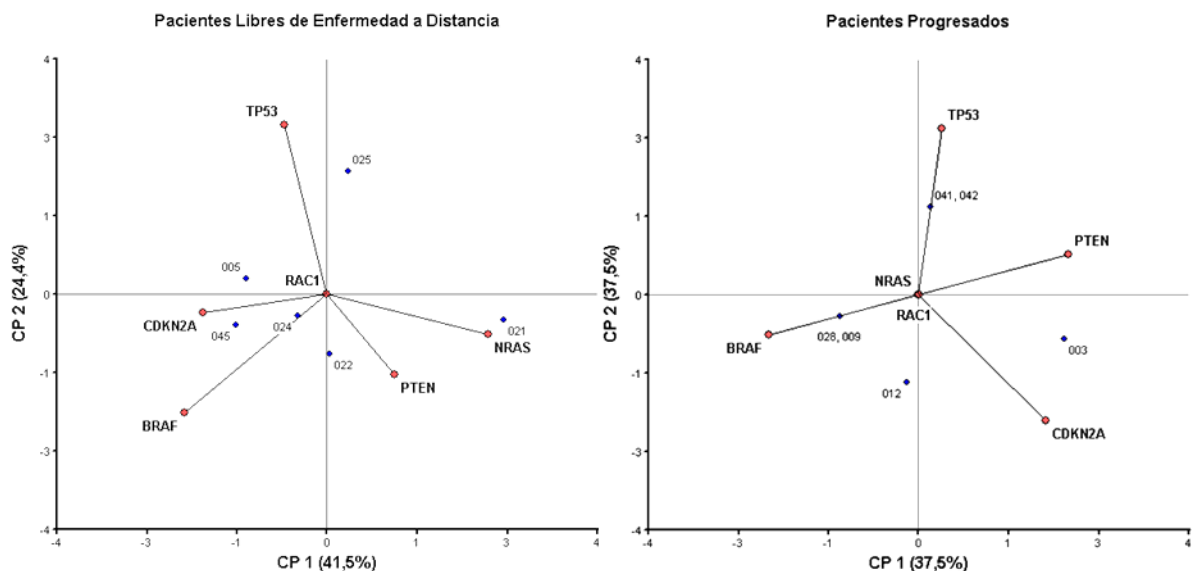


Figura 5.38. **Biplot. Izquierda. Pacientes libres de enfermedad a distancia. Derecha. Pacientes progresados.** Los puntos azules en el espacio presentan los pacientes, y los vectores los genes analizados. Los ejes son variables artificiales que surgen de la combinación lineal de las variables analizadas, que permiten explicar en parte la variabilidad de los datos.

En el grupo de pacientes progresados las mutaciones parecen ser independientes unas de otras, a excepción de BRAF y PTEN que parecen ocurrir de manera excluyente. Por el contrario en el grupo de pacientes libres de enfermedad a distancia, las mutaciones en CDKN2A y BRAF parecen ocurrir juntas, así como las mutaciones en NRAS y PTEN. Las mutaciones en TP53, parecen ocurrir de manera independiente del resto de las alteraciones. El análisis de estos dos gráficos surgiría que la ocurrencia de mutaciones en uno y otro grupo tendría diferentes dependencias, aunque es difícil interpretar si los pacientes se

distribuyen de manera diferente en los dos grupos. Por lo tanto, para seguir explorando la dependencia entre las alteraciones genéticas y analizar si existe una distribución diferencial entre los pacientes de un grupo y otro, se graficaron ambos grupos en el mismo gráfico (Figura 5.39).

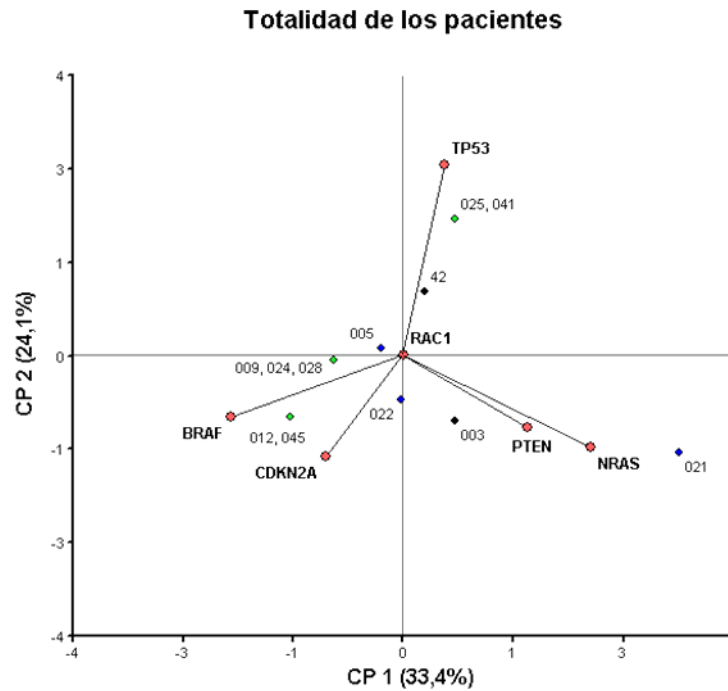


Figura 5.39. **Biplot de la totalidad de los pacientes.** Puntos azules: pacientes libre de metástasis a distancia; puntos negros: pacientes progresados; puntos verdes: pacientes de ambos grupos; vectores: genes analizados. Los ejes son variables artificiales que surgen de la combinación lineal de las variables analizadas, que permiten explicar en parte la variabilidad de los datos.

Al analizar la distribución de las mutaciones en la totalidad de los pacientes, surge que las mutaciones en BRAF se correlacionan positivamente con las alteraciones en CDKN2A y se anti-correlacionan con las alteraciones en NRAS y PTEN, las cuales están fuertemente asociadas. Las mutaciones en TP53 son eventos independientes del resto de las alteraciones. La distribución es similar a la observada en el grupo de pacientes libres de enfermedad.

En cuanto a la distribución de los pacientes, se ve que el paciente 021, tiene una combinación de alteraciones diferente al resto de los pacientes (poco común), y que el paciente 005, no se relaciona con ninguno de los genes (es el que más alteraciones tiene). En

ambos grupos hay pacientes con las mismas alteraciones, y por lo tanto caen en el mismo lugar (puntos verdes). Sin embargo, no surge de la interpretación del gráfico que haya una combinación de alteraciones diferentes en un grupo de pacientes, con respecto al otro. Por lo que no sugiere que hubiera alguna diferencia entre la combinación de mutaciones ocurridas en un grupo con respecto al otro que puede llegar a estar relacionada con la respuesta al tratamiento.

Otro enfoque analizado fue la relación de la cantidad de alteraciones *missense* halladas en los genes analizados por paciente y la DMFS (Figura 5.40). No se encontró una correlación entre estas variables ($p > 0,05$ Coef. de correlación de Spearman). Tampoco se encontró diferencia entre el número de alteraciones totales en un grupo con respecto al otro ($p > 0,05$ teste de Wilcoxon). El paciente con mayor cantidad del alteraciones encontradas (BRAF, TP53 y PTEN mutados y CDKN2A delecionada), es el paciente que lleva más meses libre de metástasis distancia. Por el contrario, dos de los pacientes con muy mala evolución, con uno y cero meses de DMFS, solo presentaron la alteración BRAF^{V600E}.

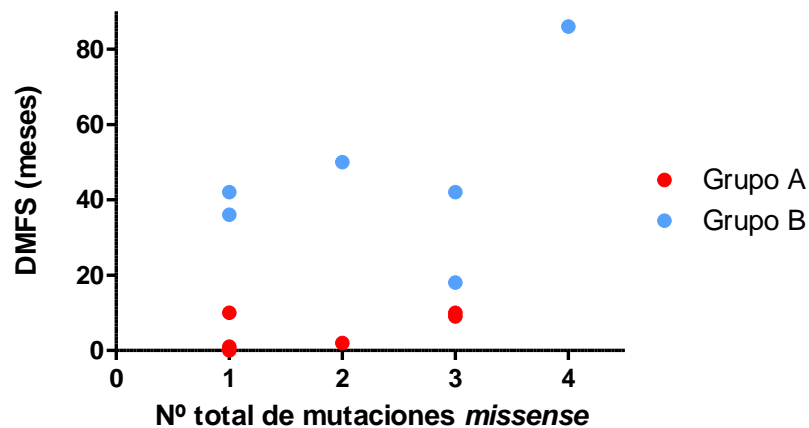


Figura 5.40. **DMFS versus N° de alteraciones totales.** Se gráfica la DMFS de cada paciente en función versus el N° de alteraciones *missense* encontradas por paciente.

6. *DISCUSIÓN*

6.1. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS FRECUENTES EN MHC ENCONTRADAS EN LAS BIOPSIAS ESTUDIADAS

El melanoma cutáneo humano (MCH) es una enfermedad compleja, con múltiples vías de señalización implicadas a nivel molecular de la patogénesis. Es el tipo de cáncer con mayor tasa mutacional entre todos los tipos de cáncer, lo cual está relacionado con la exposición a la radiación UV (Lawrence et al. 2013). Los avances en las técnicas genómicas producidos durante la última década han incrementado sustancialmente el conocimiento de los fenómenos moleculares que ocurren durante su génesis y desarrollo. Se ha descrito que ya en los nevos melanocíticos benignos existe un control aberrante del crecimiento, debido a la activación de la vía de señalización MAPK, por mutaciones somáticas que ocurren de manera mutuamente excluyente en los oncogenes BRAF o NRAS (Miller and Mihm 2006). Sin embargo, estas alteraciones no son un evento decisivo en el desarrollo del cáncer, ya que estos nevos pueden permanecer en senescencia inducida por oncogenes durante años. Deben ocurrir eventos genéticos posteriores, como alteraciones en los genes TP53, PTEN, CDKN2A, TERT, que permitan la progresión maligna de la enfermedad (Patton, *et al.*, 2005; Dankort *et al.*, 2009; Shain *et al.*, 2015).

El avance en las técnicas de secuenciación también ha permitido un mejor entendimiento del efecto a nivel inmune de las alteraciones genéticas. Diferentes alteraciones moleculares pueden tener un impacto en el microambiente tumoral, promoviendo la evasión inmune, y condicionando en última instancia la respuesta al tratamiento con inmunoterapia (Szczepaniak Sloane et al. 2017).

6.1.1. Frecuencia y coexistencia de alteraciones en las biopsias de MCH analizadas

El hallazgo más importante a nivel molecular de la patología del MHC ha sido el descubrimiento de que 40 a 70% de los casos presentan una mutación puntual en el oncogén **BRAF**, siendo V600E la más común. La señalización oncogénica de BRAF provoca que la vía MAPK se encuentre constitutivamente activa beneficiando procesos de supervivencia y proliferación (Davies et al. 2002; Siroy et al. 2015; Watson et al. 2015). Además, contribuye a la evasión inmune, al aumentar la expresión de citoquinas inmunosupresoras, que incrementan

la capacidad de las células tumorales de suprimir la actividad T citotóxica (Khalili et al. 2012; Sumimoto et al. 2006); mecanismo que se revierte por el tratamiento con inhibidores selectivos para BRAF^{V600E} (Boni et al. 2010; Frederick et al. 2013). En este estudio exploratorio el 67% (8/12) de las biopsias contenían la mutación BRAF^{V600E}. Sin embargo, la mitad de los pacientes con esta mutación se encontraba en el grupo de pacientes libres de metástasis a distancia (n=6) y la otra mitad en el grupo de pacientes progresados (n=6) (Figura 5.37).

Según la clasificación genómica del MCH propuesta por TCGA, el subtipo con mutaciones en BRAF está conformado por pacientes jóvenes, sin historia de exposición crónica a la radiación UV (Shain et al. 2015; Watson et al. 2015). En este estudio los pacientes con tumores con la mutación BRAF^{V600E} tenían un promedio de edad de aproximadamente 10 años menos con respecto al grupo de pacientes BRAF^{WT}; aunque esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

La presencia del oncogén BRAF mutado en MHC es considerado como un indicador de mal pronóstico por algunos autores, debido a que dichos tumores poseen una tendencia a generar metástasis más rápido en órganos a distancia, principalmente en el estadio III de la enfermedad (Barbour et al. 2014; Picard et al. 2014). No obstante, no se encontró que el grupo de pacientes BRAF mutado tengan una sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS) menor con respecto al grupo BRAF^{WT} ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.33).

Las mutaciones en BRAF pueden coexistir con alteraciones en los genes supresores de tumores CDKN2A, PTEN y TP53, así como con mutaciones en el promotor de TERT, entre otros genes (Berger et al. 2012; Hayward et al. 2017; Hodis et al. 2012). Según TCGA, cerca del 60% de los tumores con BRAF mutado tienen alguna alteración genética en CDKN2A y aproximadamente el 20% en PTEN (Watson et al. 2015). En este estudio, CDKN2A fue el principal gen alterado en los tumores BRAF^{V600E}, en tres de los ocho casos; y en dos biopsias se observaron alteraciones en PTEN al mismo tiempo que en BRAF. En el trabajo de Siroy *et al.*, las mutaciones en TP53 fueron la principal alteración hallada en el grupo de pacientes BRAF^{V600E}, en el 12% de los casos (Siroy et al. 2015). En este estudio en dos biopsias con BRAF mutado se encontró también alguna mutación en TP53. Por último en tres tumores BRAF^{V600E} fue la única alteración encontrada entre los genes analizados (Figura 5.37). Sin embargo, estas biopsias deben contener alteraciones genéticas *drivers* en genes no

analizados, que hayan permitido el avance hacia un estadio de melanoma maligno (Shain et al. 2015).

En una única biopsia se encontraron mutaciones en el oncogén **NRAS**, lo cual representa el 8% (1/12) de los pacientes (Figura 5.37). Sin embargo, NRAS se encuentra mutado generalmente en el 20 al 35% de los casos de MCH; siendo las alteraciones más frecuentes Q61, G12 y G13 (Hayward et al. 2017)(Hodis et al. 2012). La baja frecuencia de mutaciones en NRAS en esta cohorte puede deberse en parte a que el 67% de los pacientes contiene la mutación BRAF^{V600E}, que ocurre de manera mutuamente excluyente con las mutaciones en NRAS; ya que ambas activan la vía MAPK (Watson et al. 2015). Esta biopsia albergaba las mutaciones G12D y Q61R, que son consideradas oncogénicas y provocan la activación permanente de la GTPasa RAS, activando procesos de proliferación y supervivencia (Cerami et al. 2012b; Gao et al. 2013). La presencia de estas dos alteraciones moleculares en la misma biopsia podría deberse a heterogeneidad tumoral, aunque un estudio reciente en un modelo murino mostró que niveles endógenos de Nras^{Q61R} pero no de Nras^{G12D}, eran capaces de causar melanomagénesis *in vivo* (Burd et al. 2014). Además, el mismo paciente tenía una mutación *missense* en el exón 5 de PTEN. Sin embargo, trabajos anteriores han reportado una alta recurrencia de mutaciones o deleciones focales de PTEN, en pacientes con BRAF mutado, pero no en aquellos NRAS mutado. Tanto la pérdida de función (LoF) de Pten, como la activación de Ras conllevan a la activación de la vía PI3K-AKT, promoviendo la proliferación y supervivencia, por lo que sus efectos serían redundantes (Goel et al. 2006; Hodis et al. 2012).

Los pacientes con NRAS mutado parecen tener una mejor respuesta a la inmunoterapia, que los BRAF mutados o aquellos BRAF y NRAS WT. En un análisis en 208 pacientes estadios III/IV tratados con IL-2 en altas dosis, se observó una alta tasa de respuesta en los pacientes con mutaciones en NRAS (Joseph et al. 2012). Luego estos resultados fueron replicados en un estudio independiente, en 229 pacientes, que recibieron una o más inmunoterapias, ipilimumab, terapias anti PD-1/PD-L1 e IL-2 en altas dosis (Johnson et al. 2015). El mecanismo que lleva a que los pacientes NRAS mutado tengan una mejor respuesta aún no se conoce, pero podría en parte deberse al ambiente inmunosupresivo generado por BRAF^{V600E} y la LoF de PTEN, ya que las mutaciones en NRAS son generalmente mutuamente excluyentes con ambas alteraciones (Joseph et al. 2012). La alteración genética

de NRAS podría ser un biomarcador de buen pronóstico para el tratamiento con inmunoterapia. Si bien en este estudio exploratorio se encontró solo un paciente con NRAS mutado, este tuvo una mayor DMFS, que los pacientes BRAF mutado, y/o LoF de PTEN. Sin embargo, este paciente sufrió una mutación en PTEN. Sería interesante analizar el estatus de NRAS en el resto de los pacientes tratados con la vacuna CSF-470 para evaluar su utilidad en este tratamiento en particular.

RAC1 codifica para una GTPasa reguladora de muchos procesos celulares. La mutación **RAC1^{P29S}** se encuentra en el 5 a 9% de los casos de MHC, y le genera estabilidad a la conformación activa de la proteína (Hodis et al. 2012; Krauthammer et al. 2012). Esto provoca un aumento en la proliferación y migración de las células que la albergan, así como un aumento significativo en la expresión de PD-L1, lo cual promueve el escape tumoral (Vu et al. 2015). Sin embargo, ni en el grupo de pacientes progresados, ni en aquellos libres de enfermedad se encontró algún paciente con esta alteración genética (Figura 5.37). Esto puede deberse en parte a que **RAC1^{P29S}** es menos frecuente en pacientes con NRAS o BRAF mutado que en aquellos con NRAS y BRAF WT (Krauthammer et al. 2012). Sin embargo, **RAC1^{P29S}** ocurre de manera mutuamente excluyente únicamente con **BRAF^{V600E}** (Vu et al. 2015).

p53 interviene en diferentes procesos claves para la homeostasis celular como la respuesta al daño en el DNA, el ciclo celular y la apoptosis. En el 12 al 22% de los casos de MCH, pueden encontrarse mutaciones en el gen **TP53**, principalmente en los exones 5,6, 7 y 8 (Hayward et al. 2017; Siroy et al. 2015; Stengel et al. 2014). En este estudio exploratorio el 33% (4/12) de las biopsias portaba una mutación en este gen, dentro del dominio de unión al ADN de la proteína, esencial para su función supresora de tumor (Stengel et al. 2014)

Según la clasificación genómica del MCH sugerida por TCGA, las mutaciones en TP53 se encuentran normalmente en los subtipos con mutaciones en BRAF (~10%), NRAS (20%) o NF1 (~30%), pero son menos frecuentes en el Triple WT (Watson et al. 2015). Las mutaciones en TP53 también coexisten con alteraciones en genes supresores de tumores como CDKN2A y PTEN, entre otros genes (Berger et al. 2012; Krauthammer et al. 2012). En este trabajo, pacientes con TP53 mutado tuvieron a la vez alteraciones en BRAF, CDKN2A y PTEN. Además, en dos pacientes solo se encontró una mutación en este gen

(Figura 5.37). Sin embargo, en el trabajo de Shain *et al.*, las mutaciones en TP53 solo fueron vistas en MCH avanzado, por lo que estos tumores deberían tener mutaciones oncogénicas previas a esta, en genes no analizados (Shain et al. 2015).

En otros tipos de cáncer, las mutaciones en TP53 se han asociado con baja tasa de respuesta al tratamiento con quimioterapia y mal pronóstico (Hoffmann et al. 2008; Lindenbergh-Van Der Plas et al. 2011; Temam et al. 2000). Si bien se vio diferencia en cuanto a las curvas de DMFS entre el grupo de pacientes con y sin mutaciones, no fue significativa ($p > 0,05$ teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.34). Harían falta estudios futuros para verificar la significancia de TP53 como factor pronóstico en MCH en pacientes tratados con inmunoterapia.

El gen supresor de tumores **PTEN**, codifica para una fosfatasa de especificidad doble (cuyos sustratos pueden ser proteicos o lipídicos), que actúa como regulador negativo de la vía PI3K-AKT. El 12 al 30% de los casos de MCH presentan pérdida de función (LoF) de PTEN, dada tanto por mutaciones inactivantes como por deleciones, lo cual lleva a una sobreactivación de la vía PI3K-AKT (Cerami et al. 2012b; Hayward et al. 2017; Hodis et al. 2012). Las mutaciones se pueden dar a lo largo del gen, aunque el 33% se concentran en el exón 5. Las deleciones pueden ser totales o parciales, así como afectar el cromosoma entero (Aguissa-Touré and Li 2012).

El 42% (5/12) de los pacientes de este estudio tuvieron algún tipo de alteración en PTEN. Dos de las cinco pacientes tuvieron mutaciones puntuales dentro de la región que codifica para el dominio fosfatasa de Pten, al que se le adjudica su actividad supresora de tumores (Aguissa-Touré and Li 2012). Los tres pacientes restantes sufrieron una disminución del número de copias de PTEN. En las tres biopsias se observó una gran heterogeneidad en cuanto al número de copias de este gen; células normales coexistían con células con deleción hemicigota y homocigota de PTEN (Figura 5.31). Esto está de acuerdo con la observación de Shain *et al.*, que la deleción de PTEN es un evento tardío en la evolución del MHC; y por eso se observan distintas poblaciones en cuanto al número de copias de este gen (Shain et al. 2015). En otros tipos de cáncer, como cáncer de próstata, también fue vista una gran heterogeneidad en cuanto al número de copias de PTEN. (Krohn et al. 2014).

La LoF de PTEN genera una disminución de la función de linfocitos T *in vivo* y en biopsias con esta alteración se ha visto una reducción en el infiltrado inmune. También se

asocia con mal pronóstico en el tratamiento con inmunoterapias, como TILs y terapias anti-PD-1. Estos efectos son revertidos mediante los inhibidores para la vía PI3K-AKT (Dong et al. 2013; Peng et al. 2016). Sin embargo, los pacientes con PTEN mutado tuvieron una media de DMFS mayor que los pacientes PTEN^{WT}. En cambio, los pacientes con delección de PTEN, presentaron un promedio de DMFS menor que los PTEN^{WT} ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.35).

Las mutaciones en PTEN se observan principalmente en subtipo de MHC con alteraciones en BRAF (en el 20% de los casos), y son mucho menos frecuentes en los subtipos NF1 y Triple WT (Watson et al. 2015). Además, se considera que las mutaciones en NRAS y PTEN ocurren de manera mutuamente excluyente, como se comentó anteriormente (Goel et al. 2006; Hodis et al. 2012; Watson et al. 2015). Las alteraciones en PTEN también pueden verse junto con alteraciones en CDKN2A y TP53 (Cerami et al. 2012b; Watson et al. 2015). En este estudio las alteraciones en PTEN se vieron principalmente con mutaciones en BRAF, CDKN2A y TP53. En un único caso coexistieron las mutaciones en PTEN y NRAS (Figura 5.37).

CDKN2A codifica para dos proteínas supresoras de tumores que intervienen en la regulación del ciclo celular, p16^{INK4A} y p14^{ARF}. Es el gen supresor de tumores más involucrado en la patogénesis y predisposición al MCH. En el 20 a 40% de los casos de MCH familiar se registran mutaciones en CDKN2A en línea germinal, y el 12 a 20% de los casos de MCH esporádico tienen mutaciones somáticas en este gen (Aguilera et al. 2015; Goldstein et al. 2006; Hayward et al. 2017; Monzon et al. 1998). Estas mutaciones se encuentran principalmente en los exones 1α y 2, y afectan principalmente a p16. Además, el ~45% de MHC esporádicos tienen CDKN2A delecionado (Hayward et al. 2017; Watson et al. 2015).

En este estudio el 33% (4/12) de los pacientes presentó alguna alteración genética en CDKN2A. Dos pacientes presentaron mutaciones *missense* dentro del dominio ANK de p16, esencial para la unión a CDK4, y por tanto para su función supresora de tumor (Kannengiesser et al. 2009). En los dos pacientes restantes se observó delección de CDKN2A en el ~80% de las células tumorales. A diferencia de lo visto en PTEN, en los dos casos predominaron las poblaciones de células con delección de CDKN2A. Aunque igualmente se vio gran heterogeneidad tumoral, ya que se observaron células con delección homocigota, heterocigota y delección completa del cromosoma 9 a la vez (Figura 5.32). Según Shain et al.,

la delección de CDKN2A ocurre en un estadio avanzado de la enfermedad, únicamente se ve delección homocigota del gen en melanoma invasivo (Shain et al. 2015). Esto estaría de acuerdo con que se vean poblaciones de células con distintas alteraciones que afectan a CDKN2A en la misma biopsia.

Un estudio reciente realizado en 548 pacientes con MCH familiar, mostró que los pacientes con CDKN2A^{MUT}, tiene peor pronóstico que aquellos con CDKN2A^{WT} (Helgadottir et al. 2016). En ese estudio los pacientes con alteraciones en este gen tuvieron una menor DMFS con respecto a aquellos sin alteraciones, pero la diferencia no fue significativa ($p > 0,05$ test de Gehan-Breslow-Wilcoxon) (Figura 5.36).

Las alteraciones en CDKN2A son frecuentes en los cuatro subtipos de MCH propuestos por TCGA. Se encuentran en el 60% de los tumores BRAF mutados, el 70% de los tumores NRAS o NF1 mutados y en el 40% de los tumores Triple WT (Watson et al. 2015). Además, como se comentó anteriormente, las alteraciones en CDKN2A son comunes con las mutaciones en TERT, TP53 y PTEN (Heidenreich et al. 2014; Watson et al. 2015). En este trabajo las alteraciones en CDKN2A se vieron principalmente con BRAF y también en tumores con TP53, PTEN o TERT alterados (Figura 5.37).

Recientemente se descubrió que entre el 40% al 80% de los casos de MCH contiene alguna mutación el **promotor de TERT** (Huang et al. 2013; Hayward et al. 2017; Heidenreich et al. 2014; Horn et al. 2013). Las dos mutaciones más frecuentes son C-146T y C-124T, las cuales ocurren de manera mutuamente excluyente, creando nuevos sitios de unión para factores de transcripción de la familia Ets/TCF (Fredriksson et al. 2014). Según Huang *et al.* ambas alteraciones provocan el aumento del mRNA de TERT entre 2 y 4 veces con respecto al promotor WT (Huang et al. 2013).

Las mutaciones en TERT se han encontrado con mayor frecuencia que las mutaciones en BRAF y NRAS (las cuales son oncogénicas) incluso en lesiones intermedias y melanoma *in situ*. Esto sugiere que las alteraciones en TERT son un evento genético temprano en el desarrollo del MCH y podría ser un mecanismo que contribuya a hacer un *bypass* de la senescencia inducida por oncogenes, favoreciendo que las células adquieran mutaciones oncogénicas subsecuentes (Huang et al. 2013; Shain et al. 2015). Sin embargo, en un estudio reciente se encontró una asociación modesta entre la reducción del largo de los telómeros y

los promotores más activos (Hayward et al. 2017). Por lo que el papel de las mutaciones en el promotor de TERT en la melanomagénesis aún es incierto.

Las mutaciones en el promotor de TERT, generalmente coexisten tanto con las alteraciones en BRAF (~75%) como en NRAS (~70%) y NF1 (~80%), pero son menos comunes en el subtipo Triple WT (Watson et al. 2015). Según Horn y Heidenreich las alteraciones en el promotor de TERT coexiste con mayor frecuencia en tumores con alteraciones en BRAF y CDKN2A (Heidenreich et al. 2014; Horn et al. 2013). La única biopsia de las siete analizadas en este estudio exploratorio que contenía una mutación en el promotor de TERT, también tenía mutaciones en los genes BRAF y CDKN2A (Figura 5.37).

En el trabajo de Heidenreich *et al.* las mutaciones en el promotor de TERT tuvieron una correlación positiva significativa con los marcadores de mal pronóstico en MCH, alto índice de Breslow y ulceración (Heidenreich et al. 2014). El único pacientes con el promotor de TERT mutado en este estudio, tuvo una DMFS de 9 meses y una OS de 17 meses. Estudios futuros son necesarios para evaluar la utilidad de TERT como factor pronóstico en MCH.

Si bien algunas de las alteraciones discutidas están asociadas con el pronóstico al tratamiento con inmunoterapias, y mutaciones otros de estos genes se han asociado con mala evolución de la enfermedad, estas alteraciones moleculares pueden encontrarse tanto en pacientes respondedores como no respondedores, en este estudio, así como en estudios previos. Por lo tanto, su utilidad como biomarcadores es cuestionada. Además, al explorar las diferencias en la ocurrencia de estas alteraciones en los dos grupos de pacientes, tampoco surgió alguna interrelación que correlacione con la evolución de los pacientes y que pueda funcionar como biomarcador de la respuesta al tratamiento con CSF-470.

7. CONCLUSIÓN

Los principales aportes de esta Tesis fueron:

- Se logró la puesta a punto de doce Nested-PCRs, desde el diseño de los primers hasta la secuenciación; que permiten analizar doce regiones de mutación frecuente en MCH.
- El 67% (8/12) de los pacientes de este estudio presentó la mutación BRAF^{V600E} y en el 33% (4/12) de ellos se encontró alguna mutación en TP53. El 42% (5/12) de los pacientes tuvo alguna mutación *missense* o delección de PTEN, y el 33% (4/12) de CDKN2A. Un paciente presentó una mutación en el promotor de TERT, otro tuvo mutaciones en NRAS y ningún paciente presentó mutaciones en el oncogén RAC1.
- No se encontró diferencia en cuanto a la ocurrencia de mutaciones entre los pacientes libres de enfermedad a distancia y aquellos progresados que se correlacione con la evolución clínica de los pacientes.

Cabe destacar que el número de pacientes analizados en este estudio exploratorio fue limitado. Sería importante ampliar los casos a medida que se vayan incorporando nuevos pacientes al ensayo clínico, lo cual podría complementarse con estudios transcriptómicos. No obstante, la obtención de tumores aptos para este último análisis es sumamente complicado. La realización de estos estudios adicionales permitiría una mejor comprensión de la relación entre las alteraciones genómicas y la evolución de la enfermedad, y además podría permitir predecir la respuesta a las inmunoterapias, entre ellas la vacuna CSF-470.

8. *BIBLIOGRAFÍA*

Bibliografía

- Adari, H., D. R. Lowy, B. M. Willumsen, C. J. Der, and F. McCormick. 1988. "Guanosine Triphosphatase Activating Protein (GAP) Interacts with the p21 Ras Effector Binding Domain." *Science (New York, N.Y.)* 240(4851):518–21.
- Aguilera, Paula et al. 2015. "J Clin Exp Dermatol Res 2014 P Aguilera _ Familial and Sporadic MM in Barcelona." 5(5).
- Aguissa-Touré, Almass Houd and Gang Li. 2012. "Genetic Alterations of PTEN in Human Melanoma." *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(9):1475–91.
- Ahn, Soomin et al. 2013. "Comparison of Three BRAF Mutation Tests in Formalin-Fixed Paraffin Embedded Clinical Samples." *Korean Journal of Pathology* 47(4):348–54.
- Algazi, Alain P., Christopher W. Soon, and Adil I. Daud. 2010. "Treatment of Cutaneous Melanoma: Current Approaches and Future Prospects." *Cancer management and research* 2(1):197–211. Retrieved (<http://www.dovepress.com/treatment-of-cutaneous-melanoma-current-approaches-and-future-prospect-peer-reviewed-article-CMR>).
- Alimonti, Andrea et al. 2010. "Subtle Variations in Pten Dose Determine Cancer Susceptibility." *Nature Genetics* 42(5):454–58. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.556>).
- Aris, Mariana, José Mordoh, and María Marcela Barrio. 2017. "Immunomodulatory Monoclonal Antibodies in Combined Immunotherapy Trials for Cutaneous Melanoma." *Frontiers in Immunology* 8(AUG):1–15.
- de Arriba Muñoz, L. and A. Berrocoso Martínez. 2014. "Tratamiento Con Hormona de Crecimiento En El Niño Nacido PEG." *El niño nacido para la edad gestacional* 47–56.

- Arvelo, Francisco and Alvaro Morales. 2004. "Telomero, Telomerasa Y Cancer." *Acta Científica Venezolana* 55(3):288–303.
- Atkins, Michael B. et al. 2008. "Phase III Trial Comparing Concurrent Biochemotherapy with Cisplatin, Vinblastine, Dacarbazine, Interleukin-2, and Interferon Alfa-2b with Cisplatin, Vinblastine, and Dacarbazine Alone in Patients with Metastatic Malignant Melanoma (E3695): A Trial Coordin." *Journal of Clinical Oncology* 26(35):5748–54.
- Bagheri, S. et al. 2006. "Genes and Pathways Downstream of Telomerase in Melanoma Metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11306–11. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16847266).
- Balch, Charles M. et al. 2009. "Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification." *Journal of Clinical Oncology* 27(36):6199–6206.
- Barbour, Andrew P. et al. 2014. "BRAF Mutation Status Is an Independent Prognostic Factor for Resected Stage IIIB and IIIC Melanoma: Implications for Melanoma Staging and Adjuvant Therapy." *European Journal of Cancer* 50(15):2668–76. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.06.009>).
- Barrio, María M. et al. 2006. "A Phase I Study of an Allogeneic Cell Vaccine (VACCIMEL) With GM-CSF in Melanoma Patients." *Journal of Immunotherapy* 29(4):444–54. Retrieved (<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002371-200607000-00011>).
- Berger, Michael F. et al. 2012. "Melanoma Genome Sequencing Reveals Frequent PREX2 Mutations." *Nature* 485(7399):502–6. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11071>).

- Boni, Andrea et al. 2010. "Selective BRAFV600E Inhibition Enhances T-Cell Recognition of Melanoma without Affecting Lymphocyte Function." *Cancer Research* 70(13):5213–19.
- Burd, Christin E. et al. 2014. "Mutation-Specific RAS Oncogenicity Explains NRAS Codon 61 Selection in Melanoma." *Cancer Discovery* 4(12):1418–29.
- Cerami, Ethan et al. 2012a. "The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data." *Cancer Discovery* 2(5):401–4.
- Cerami, Ethan et al. 2012b. "The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data." *Cancer Discovery* 2(5):401–4.
- Chapman, Paul B. et al. 2011. "Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation." *New England Journal of Medicine* 364(26):2507–16. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1103782>).
- Chin, Lynda et al. 1997. "Cooperative Effects of INK4a and Ras in Melanoma Susceptibility in Vivo." *Genes and Development* 11(21):2822–34.
- Chin, Lynda. 2003. "The Genetics of Malignant Melanoma: Lessons from Mouse and Man." *Nature Reviews Cancer* 3(8):559–70. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrc1145>).
- Chudnovsky, Yakov, Paul A. Khavari, and Amy E. Adams. 2005. "Melanoma Genetics and the Development of Rational Therapeutics." *Journal of Clinical Investigation* 115(4):813–24.
- Dankort, David et al. 2009. "BRAF V600E Cooperates with PTEN Silencing to Elicit Metastatic Melanoma." *Nature genetics* 41(5):544–52.
- Davies, Helen et al. 2002. "Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer."

- Nature* 417(6892):949–54. Retrieved
(<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature00766>).
- Dieffenbach, CW and TM Lowe. 1993. “General Concepts for PCR Primer Design.” *PCR methods and* 29–37. Retrieved
(<http://www.mendeley.com/research/general-concepts-for-pcr-primer-design/>).
- Dika, E. et al. 2013. “KIT, NRAS, and BRAF Mutations in Nail Apparatus Melanoma.” *Pigment Cell and Melanoma Research* 26(5):758–60.
- Dong, Y. et al. 2013. “PTEN Functions as a Melanoma Tumor Suppressor by Promoting Host Immune Response.” *Oncogene* 21(3):430–46. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141770>).
- Duman, Nilay et al. 2015. “Nevus-Associated versus de Novo Melanoma: Do They Have Different Characteristics and Prognoses?” *Dermatopathology* 2(1):46–51. Retrieved (<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000375490>).
- Eggermont, Alexander M. M. et al. 2012. “Long-Term Results of the Randomized Phase III Trial EORTC 18991 of Adjuvant Therapy with Pegylated Interferon Alfa-2b versus Observation in Resected Stage III Melanoma.” *Journal of Clinical Oncology* 30(31):3810–18.
- Eggermont, Alexander M. M. et al. 2016. “Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy.” *New England Journal of Medicine* 375(19):1845–55. Retrieved
(<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1611299>).
- Forbes, Simon A. et al. 2009. “COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations In Cancer): A Resource to Investigate Acquired Mutations in Human Cancer.” *Nucleic Acids Research* 38(SUPPL.1):652–57.
- Fouret., Stephane Temam; Antoine Flahault; Sophie Perie; Guy Monceaux; Florence Coulet; Patrice Callard; Jean-Francois Bernaudin; Jean Lacau St

- Guill and Pierre. 2000. “p53 G E N E S T a T U S a S a P R E D I c T O R O F T U M O R R E S P O N S E T O Induction Chemotherapy of Patients With Locoregionally Advanced Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck.” *Journal of Clinical Oncology* 18(2):385–94.
- Frackman, By Susan, Gary Kobs, Dan Simpson, Doug Storts, and Promega Corporation. 1998. “Betaine and DMSO : Enhancing Agents for PCR.” *Promega Notes* 65(65):9–12. Retrieved (http://taq.ch/pnotes/65/6921_27/6921_27_core.pdf).
- Frech, M. et al. 1994. “Role of Glutamine-61 in the Hydrolysis of GTP by p21H-Ras: An Experimental and Theoretical Study.” *Biochemistry* 33(11):3237–44. Retrieved (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00177a014>).
- Frederick, Dennie T. et al. 2013. “BRAF Inhibition Is Associated with Enhanced Melanoma Antigen Expression and a More Favorable Tumor Microenvironment in Patients with Metastatic Melanoma.” *Clinical Cancer Research* 19(5):1225–31.
- Fredriksson, Nils J., Lars Ny, Jonas A. Nilsson, and Erik Larsson. 2014. “Systematic Analysis of Noncoding Somatic Mutations and Gene Expression Alterations across 14 Tumor Types.” *Nature Genetics* 46(12):1258–63. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/ng.3141>).
- Frey, Ulrich H., Hagen S. Bachmann, Jürgen Peters, and Winfried Siffert. 2008. “PCR-Amplification of GC-Rich Regions: ‘Slowdown PCR.’” *Nature Protocols* 3(8):1312–17. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nprot.2008.112>).
- Gao, Jianjiong et al. 2013. “Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal.” *Science signaling* 6(269):p11.

Retrieved

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23550210><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4160307>).

Gasparotto, D. et al. 1999. “Loss of Heterozygosity at 10q in Tumors of the Upper Respiratory Tract Is Associated with Poor Prognosis.” *International journal of cancer. Journal international du cancer* 84(4):432–36. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404099>).

Goel, Vikas K., Alexander J. F. Lazar, Carla L. Warneke, Mark S. Redston, and Frank G. Haluska. 2006. “Examination of Mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma.” *Journal of Investigative Dermatology* 126(1):154–60. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15325963>).

Goldstein, Alisa M. et al. 2006. “High-Risk Melanoma Susceptibility Genes and Pancreatic Cancer, Neural System Tumors, and Uveal Melanoma across GenoMEL.” *Cancer Research* 66(20):9818–28.

Gray-Schopfer, Vanessa, Claudia Wellbrock, and Richard Marais. 2007. “Melanoma Biology and New Targeted Therapy.” *Nature* 445(7130):851–57. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature05661>).

Halaban, Ruth. 2015. “RAC1 and Melanoma.” *Clinical Therapeutics* 37(3):682–85. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.10.027>).

Hauschild, Axel et al. 2010. “Efficacy of Low-Dose Interferon α 2a 18 versus 60 Months of Treatment in Patients with Primary Melanoma of ≥ 1.5 Mm Tumor Thickness: Results of a Randomized Phase III DeCOG Trial.” *Journal of Clinical Oncology* 28(5):841–46.

Hayward, Nicholas K. et al. 2017. “Whole-Genome Landscapes of Major Melanoma Subtypes.” *Nature* 545(7653):175–80. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature22071>).

- Heidenreich, B. et al. 2014. “Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations in Primary Cutaneous Melanoma.” *Nat Commun* 5:3401. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569790>).
- Helgadottir, Hildur et al. 2016. “Germline CDKN2A Mutation Status and Survival in Familial Melanoma Cases.” *Journal of the National Cancer Institute* 108(11):1–8.
- Hodis, Eran et al. 2012. “A Landscape of Driver Mutations in Melanoma.” *Cell* 150(2):251–63.
- Hoffmann, Thomas K. et al. 2008. “Alterations in the p53 Pathway and Their Association with Radio- and Chemosensitivity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *Oral Oncology* 44(12):1100–1109.
- Horn, S. et al. 2013. “TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma.” *Science* 339(6122):959–61. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1230062>).
- Huang, F. W. et al. 2013. “Highly Recurrent TERT Promoter Mutations in Human Melanoma.” *Science* 339(6122):957–59. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1229259>).
- Ichii-Nakato, Nami et al. 2006. “High Frequency of BRAFV600E Mutation in Acquired Nevi and Small Congenital Nevi, but Low Frequency of Mutation in Medium-Sized Congenital Nevi.” *Journal of Investigative Dermatology* 126(9):2111–18. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15330426>).
- Ishida, Yasumasa, Yasutoshi Agata, Keiichi Shibahara, and Tasuki Honjo. 1992. “Induced Expression of PD-1, a Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, upon Programmed Cell Death.” *The EMBO journal* 11(11):3887–95. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556898&tool=>

pmcentrez&rendertype=abstract).

Jhappan, Chamelli, Frances P. Noonan, and Glenn Merlino. 2003. "Ultraviolet Radiation and Cutaneous Malignant Melanoma." *Oncogene* 22(20):3099–3112. Retrieved

(<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1206450>).

Johnson, D. B. et al. 2015. "Impact of NRAS Mutations for Patients with Advanced Melanoma Treated with Immune Therapies." *Cancer Immunology Research* 3(3):288–95. Retrieved

(<http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-14-0207>).

Joseph, Richard W. et al. 2012. "Correlation of NRAS Mutations with Clinical Response to High-Dose IL-2 in Patients with Advanced Melanoma."

Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997) 35(1):66–72.

Retrieved

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130161> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3241890>).

Kannengiesser, Caroline et al. 2009. "Functional, Structural, and Genetic Evaluation of 20 CDKN2A Germ Line Mutations Identified in Melanoma-Prone Families or Patients." *Human Mutation* 30(4):564–74.

Kawazu, M. et al. 2013. "Transforming Mutations of RAC Guanosine Triphosphatases in Human Cancers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(8):3029–34. Retrieved

(<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1216141110>).

Keir, Mary E. et al. 2006. "Tissue Expression of PD-L1 Mediates Peripheral T Cell Tolerance." *The Journal of Experimental Medicine* 203(4):883–95.

Retrieved (<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20051776>).

Khalili, Jahan S. et al. 2012. "Oncogenic BRAF(V600E) Promotes Stromal Cell-

Mediated Immunosuppression via Induction of Interleukin-1 in Melanoma.”
Clinical Cancer Research 18(19):5329–40.

Kinsler, Veronica A. et al. 2013. “Multiple Congenital Melanocytic Nevi and Neurocutaneous Melanosis Are Caused by Postzygotic Mutations in Codon 61 of NRAS.” *Journal of Investigative Dermatology* 133(9):2229–36.

Retrieved

(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15363855>).

Kirkwood, John M. et al. 2002. “Mechanisms and Management of Toxicities Associated with High-Dose Interferon Alfa-2b Therapy.” *Journal of Clinical Oncology* 20(17):3703–18.

Korbie, Darren J. and John S. Mattick. 2008. “Touchdown PCR for Increased Specificity and Sensitivity in PCR Amplification.” *Nature Protocols* 3(9):1452–56. Retrieved

(<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.133>).

Krauthammer, Michael et al. 2012. “Exome Sequencing Identifies Recurrent Somatic RAC1 Mutations in Melanoma.” *Nature Genetics* 44(9):1006–14. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng.2359>).

Krohn, Antje et al. 2014. “Heterogeneity and Chronology of PTEN Deletion and ERG Fusion in Prostate Cancer.” *Modern Pathology* 27(12):1612–20.

Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/modpathol.2014.70>).

Larkin, James et al. 2014. “Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF - Mutated Melanoma.” *New England Journal of Medicine* 371(20):1867–76.

Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1408868>).

Latorre C., Loria F., y Dora. 2011. “Melanoma Cutáneo : Mortalidad Y Características de Los Tumores Incidentes En Los Dos Extremos de La Vida En La Argentina.” 18(1):30–35.

Lawrence, Michael S. et al. 2013. “Mutational Heterogeneity in Cancer and the

- Search for New Cancer-Associated Genes.” *Nature* 499(7457):214–18.
 Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12213>).
- Lemecq, Charlotte, Jeffrey Infante, and Hendrik-Tobias Arkenau. 2012. “The Potential for BRAF V600 Inhibitors in Advanced Cutaneous Melanoma: Rationale and Latest Evidence.” *Therapeutic advances in medical oncology* 4(2):61–73. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3296083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Lindenbergh-Van Der Plas, Marlon et al. 2011. “Prognostic Significance of Truncating TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *Clinical Cancer Research* 17(11):3733–41.
- Liu, Wendy et al. 2006. “Rate of Growth in Melanomas.” *Archives of Dermatology* 142(12). Retrieved (<http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.142.12.1551>).
- Long, Georgina V. et al. 2016. “Overall Survival and Durable Responses in Patients with BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined with Trametinib.” *Journal of Clinical Oncology* 34(8):871–78.
- Loria, Dora I., Abel González, and Clara Latorre. 2010. “Epidemiología Del Melanoma Cutáneo En Argentina : Análisis Del Registro Argentino de Melanoma Cutáneo Cutaneous Melanoma Epidemiology in Argentina : Analysis from the Argentine Cutaneous Melanoma Registry.” *Dermatol Argent* 16(1):39–45.
- Ma, Xiao et al. 2014. “Recurrent TERT Promoter Mutations in Non-Small Cell Lung Cancers.” *Lung Cancer* 86(3):369–73. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.10.009>).

- Madorsky Rowdo, Florencia Paula, Antonela Baron, Mariela Urrutia, and José Mordoh. 2015. "Immunotherapy in Cancer: A Combat between Tumors and the Immune System; You Win Some, You Lose Some." *Frontiers in Immunology* 6(MAR):2–13.
- Maio, M. 2012. "Melanoma as a Model Tumour for Immuno-Oncology." *Annals of Oncology* 23(SUPPL.8).
- Malkhasyan, Karen A., Yousef Zakharia, and Mohammed Milhem. 2017. "Quality-of-Life Outcomes in Patients with Advanced Melanoma: A Review of the Literature." *Pigment Cell & Melanoma Research* (September):1–10. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1111/pcmr.12647>).
- Management, Cancer. 2017. "Challenging the Standard of Care in Advanced Melanoma : Focus on Pembrolizumab." 433–42.
- Mandalà, Mario, Francesco De Logu, Barbara Merelli, Romina Nassini, and Daniela Massi. 2017. "Immunomodulating Property of MAPK Inhibitors: From Translational Knowledge to Clinical Implementation." *Laboratory Investigation* 97132(August):166–75. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2016.132>).
- Mar, Victoria J. et al. 2014. "Clinical and Pathological Associations of the Activating RAC1 P29S Mutation in Primary Cutaneous Melanoma." *Pigment Cell and Melanoma Research* 27(6):1117–25.
- Martini, Miriam, Maria Chiara De Santis, Laura Braccini, Federico Gulluni, and Emilio Hirsch. 2014. "PI3K/AKT Signaling Pathway and Cancer: An Updated Review." *Annals of Medicine* 46(6):372–83. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07853890.2014.912836>).
- Michaloglou, Chrysiis et al. 2005. "BRAFE600-Associated Senescence-like Cell Cycle Arrest of Human Naevi." *Nature* 436(7051):720–24. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03890>).

- Miller, Arlo J. and Martin C. Mihm. 2006. "Melanoma." 51–65.
- Mohr, Peter et al. 2015. "Intermittent High-Dose Intravenous Interferon Alfa-2b for Adjuvant Treatment of Stage III Melanoma: Final Analysis of a Randomized Phase III Dermatologic Cooperative Oncology Group Trial." *Journal of Clinical Oncology* 33(34):4077–84.
- Montagut, Clara et al. 2008. "Elevated CRAF as a Potential Mechanism of Acquired Resistance to BRAF Inhibition in Melanoma." *Cancer Research* 68(12):4853–61.
- Monzon, Jose et al. 1998. "CDKN2A Mutations in Multiple Primary Melanomas." *New England Journal of Medicine* 338(13):879–87. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199803263381305>).
- Mordoh, José et al. 2017. "Phase II Study of Adjuvant Immunotherapy with the CSF-470 Vaccine plus Bacillus Calmette-Guerin plus Recombinant Human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor vs Medium-Dose Interferon Alpha 2B in Stages IIB, IIC, and III Cutaneous Melanoma Patie." *Frontiers in Immunology* 8(MAY):1–15.
- Mozuraitiene, Julija, Kristina Bielskiene, Vydmantas Atkočius, and Danute Labeikyte. 2015. "Molecular Alterations in Signal Pathways of Melanoma and New Personalized Treatment Strategies: Targeting of Notch." *Medicina (Lithuania)* 51(3):133–45.
- Nazarian, Ramin et al. 2010. "Melanomas Acquire Resistance to B-RAF(V600E) Inhibition by RTK or N-RAS Upregulation." *Nature* 468(7326):973–77. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nature09626>).
- Nikolaev, Sergey I. et al. 2011. "Exome Sequencing Identifies Recurrent Somatic MAP2K1 and MAP2K2 Mutations in Melanoma." *Nature Genetics* 44(2):133–39. Retrieved

- (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.1026>).
- Okazaki, Taku and Tasuku Honjo. 2007. "PD-1 and PD-1 Ligands: From Discovery to Clinical Application." *International Immunology* 19(7):813–24.
- Paraiso, Kim H. T. et al. 2011. "PTEN Loss Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through the Suppression of BIM Expression." *Cancer Research* 71(7):2750–60.
- Patton, E.Elizabet. et al. 2005. "BRAF Mutations Are Sufficient to Promote Nevi Formation and Cooperate with p53 in the Genesis of Melanoma." *Current Biology* 15(3):249–54. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609829>).
- Payne, Miranda J. et al. 2014. "Phase II Pilot Study of Intravenous High-Dose Interferon with or without Maintenance Treatment in Melanoma at High Risk of Recurrence." *Journal of Clinical Oncology* 32(3):185–90.
- Peng, Weiyi et al. 2016. "Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-mediated Immunotherapy." *Cancer Discovery* 6(2):202–16.
- Philpott, Charlotte, Hannah Tovell, Ian M. Frayling, David N. Cooper, and Meena Upadhyaya. 2017. "The NF1 Somatic Mutational Landscape in Sporadic Human Cancers." *Human Genomics* 11(1):13. Retrieved (<http://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-017-0109-3>).
- Picard, M. et al. 2014. "Is BRAF a Prognostic Factor in Stage III Skin Melanoma? A Retrospective Study of 72 Patients after Positive Sentinel Lymph Node Dissection." *British Journal of Dermatology* 171(1):108–14.
- Pinzón, Carlos Eduardo, Martha Lucía Serrano, and María Carolina Sanabria. 2009. "Papel de La Vía Fosfatidilinositol 3 Kinasa (PI3K/Akt) En Humanos." *Revista Ciencias de la Salud* 7(2):47–66.

- Read, Jazlyn, Karin A. W. Wadt, and Nicholas K. Hayward. 2016. "Melanoma Genetics." *Journal of Medical Genetics* 53(1):1–14. Retrieved (<http://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2015-103150>).
- Reddy, Bobby Y., David M. Miller, and Hensin Tsao. 2017. "Somatic Driver Mutations in Melanoma." *Cancer* 123:2104–17.
- Ridley, Anne J. 2001. "Rho Family Proteins: Coordinating Cell Responses." *Trends in Cell Biology* 11(12):471–77.
- Robert, Caroline et al. 2011. "Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma." *New England Journal of Medicine* 364(26):2517–26. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1104621>).
- Robert, Caroline, Boguslawa Karaszewska, et al. 2015. "Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib." *New England Journal of Medicine* 372(1):30–39. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1412690>).
- Robert, Caroline, Georgina V. Long, et al. 2015. "Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation." *New England Journal of Medicine* 372(4):320–30. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1412082>).
- Robert, Caroline, Jacob Schachter, et al. 2015. "Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma." *New England Journal of Medicine* 372(26):2521–32. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1503093>).
- Robertson, K. D. and P. A. Jones. 1999. "Tissue-Specific Alternative Splicing in the Human *INK4a/ARF* Cell Cycle Regulatory Locus." *Oncogene* 18(26):3810–20. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10445844%5Chttp://www.nature.c>

om/onc/journal/v18/n26/pdf/1202737a.pdf).

Sandru, A., S. Voinea, E. Panaitescu, and A. Blidaru. 2014. “Survival Rates of Patients with Malignant Melanoma.” *Journal of Medicine and Life* 7(4):572–76.

Shain, A. Hunter et al. 2015. “The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions.” *New England Journal of Medicine* 373(20):1926–36. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1502583>).

Sharpless, Norman E., Matthew R. Ramsey, Periasamy Balasubramanian, Diego H. Castrillon, and Ronald A. DePinho. 2004. “The Differential Impact of p16INK4a or p19ARF Deficiency on Cell Growth and Tumorigenesis.” *Oncogene* 23(2):379–85. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1207074>).

Shen-Li, Hong, Susan Koujak, Matthias Szablocs, and Ramon Parsons. 2010. “Reduction of Pten Dose Leads to Neoplastic Development in Multiple Organs of PtenshRNA Mice.” *Cancer Biology and Therapy* 10(11):1194–1200.

Shi, Hubing et al. 2012. “Melanoma Whole-Exome Sequencing Identifies V600E-BRAF Amplification-Mediated Acquired B-RAF Inhibitor Resistance.” *Nature Communications* 3:724. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms1727>).

Siegel, R., K. Miller, and A. Jemal. 2017. “Cancer Statistics , 2017 .” *CA Cancer J Clin* 65(1):29. Retrieved (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254/pdf>).

Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2016. “Cancer Statistics, 2016.” *CA Cancer J Clin* 66(1):7–30.

Siroy, Alan E. et al. 2015. “Beyond BRAFV600: Clinical Mutation Panel Testing by Next-Generation Sequencing in Advanced Melanoma.” *Journal*

- of Investigative Dermatology* 135(2):508–15. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15371189>).
- Stengel, Anna, Susanne Schnittger, Sandra Weissmann, Sabrina Kuznia, and Wolfgang Kern. 2014. “TP53 Mutations Occur in 15 . 7 % of ALL and Are Associated with MYC -Rearrangement , Low Hypodiploidy and a Poor Prognosis.” *Blood* 124(2):251–59.
- Sumimoto, Hidetoshi, Fumie Imabayashi, Tomoko Iwata, and Yutaka Kawakami. 2006. “The BRAF–MAPK Signaling Pathway Is Essential for Cancer-Immune Evasion in Human Melanoma Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 203(7):1651–56. Retrieved (<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20051848>).
- Szczepaniak Sloane, Robert A. et al. 2017. “Interaction of Molecular Alterations with Immune Response in Melanoma.” *Cancer* 123:2130–42.
- Takahashi, T. et al. 2000. “Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25(+)/CD4(+) Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4.” *The Journal of experimental medicine* 192(2):303–10. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899917><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2193248><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899917><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2193248><http://www.pubmed>).
- Tímár, J., L. Vizkeleti, V. Doma, T. Barbai, and E. Rásó. 2016. “Genetic Progression of Malignant Melanoma.” *Cancer and Metastasis Reviews* 35(1):93–107.
- Verselis, S. J., J. G. Rheinwald, J. F. Fraumeni, and F. P. Li. 2000. “Novel p53 Splice Site Mutations in Three Families with Li-Fraumeni Syndrome.” *Oncogene* 19(37):4230–35. Retrieved

- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10980596>).
- Viros, Amaya et al. 2014. “Ultraviolet Radiation Accelerates BRAF-Driven Melanomagenesis by Targeting TP53.” *Nature* 511(7510):478–82. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nature13298>).
- Vu, Ha Linh, Sheera Rosenbaum, Timothy J. Purwin, Michael A. Davies, and Andrew E. Aplin. 2015. “RAC1 P29S Regulates PD-L1 Expression in Melanoma.” *Pigment Cell and Melanoma Research* 28(5):590–98.
- Watson, Ian R. et al. 2014. “The RAC1 P29S Hotspot Mutation in Melanoma Confers Resistance to Pharmacological Inhibition of RAF.” *Cancer Research* 74(17):4845–52.
- Watson, Ian R. et al. 2015. “Genomic Classification of Cutaneous Melanoma.” *Cell* 161(7):1681–96.
- Yilmaz, Ismail et al. 2015. “BRAF, KIT, NRAS, GNAQ and GNA11 Mutation Analysis in Cutaneous Melanomas in Turkish Population.” *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 58(3):279. Retrieved (<http://www.ijpmonline.org/text.asp?2015/58/3/279/162831>).
- Yoshimoto, M. et al. 2007. “FISH Analysis of 107 Prostate Cancers Shows That PTEN Genomic Deletion Is Associated with Poor Clinical Outcome.” 678–85.
- Yu, Bing, Sandra A. O’Toole, and Ronald J. Trent. 2015. “Somatic DNA Mutation Analysis in Targeted Therapy of Solid Tumours.” *Translational pediatrics* 4(2):125–38. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4729091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Zhang, W. et al. 2010. “Comparison of the Inhibitory Effects of Three Transcriptional Variants of CDKN2A in Human Lung Cancer Cell Line A549.” *J Exp Clin Cancer Res* 29(Figure 1):74. Retrieved

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565749>).

- Zheng, Xiaoyong et al. 2014. “High Frequency of TERT Promoter Mutation in Small Cell Carcinoma of Bladder, but Not in Small Cell Carcinoma of Other Origins.” *Journal of Hematology & Oncology* 7(1):47. Retrieved (<http://jhonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-014-0047-7>).
- Zou, Weiping and Lieping Chen. 2008. “Inhibitory B7-Family Molecules in the Tumour Microenvironment.” *Nature Reviews Immunology* 8(6):467–77. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri2326>).