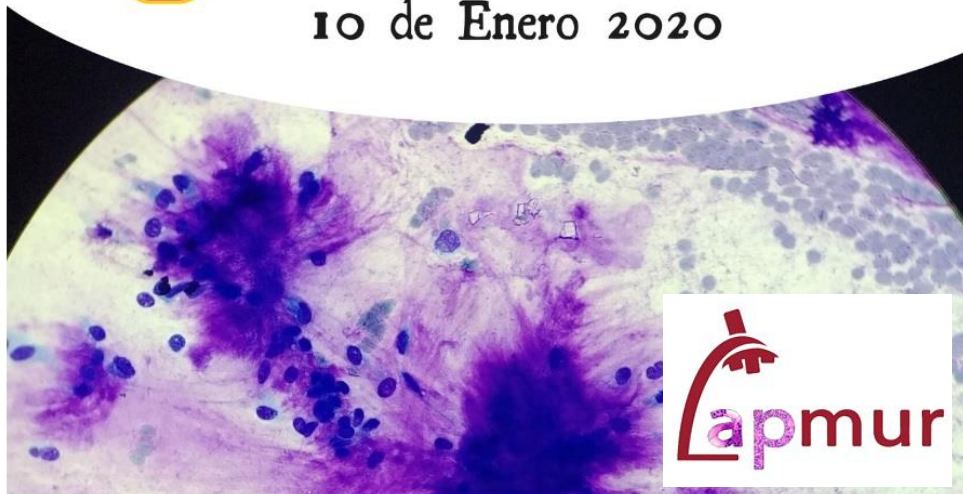




LIII Reunión Territorial
de la Región de Murcia
10 de Enero 2020



DETERMINACIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE HETEROGENEIDAD EN LA MUTACIÓN BRAF.

Complejo Hospitalario de Cartagena

**Sebastián Ortiz Reina, Tamara Ibarra Selva, M^a Nuria Morales Suárez,
África Fernández Valera, María Ruiz Campayo, Esmeralda de la Sovera
González**

El melanoma es un tumor maligno cuya incidencia aumenta constantemente, en el que la existencia de metástasis conlleva un mal pronóstico, por su agresividad y resistencia a la quimioterapia.

En las últimas décadas no ha habido un avance relevante, que suponga una nueva opción de tratamiento. Hasta el momento, ningún tratamiento había demostrado prolongar significativamente su supervivencia

- Es un tumor de gran agresividad biológica con una mediana de supervivencia menor al año

En el 2002,
se descubrió
una mutación
genética

Sustitución
de una
timina por
adenina
(pos 600)→
sustitución
de *valina*
por *ácido*
glutámico

Activación
permanente
de las
proteínas
BRAF

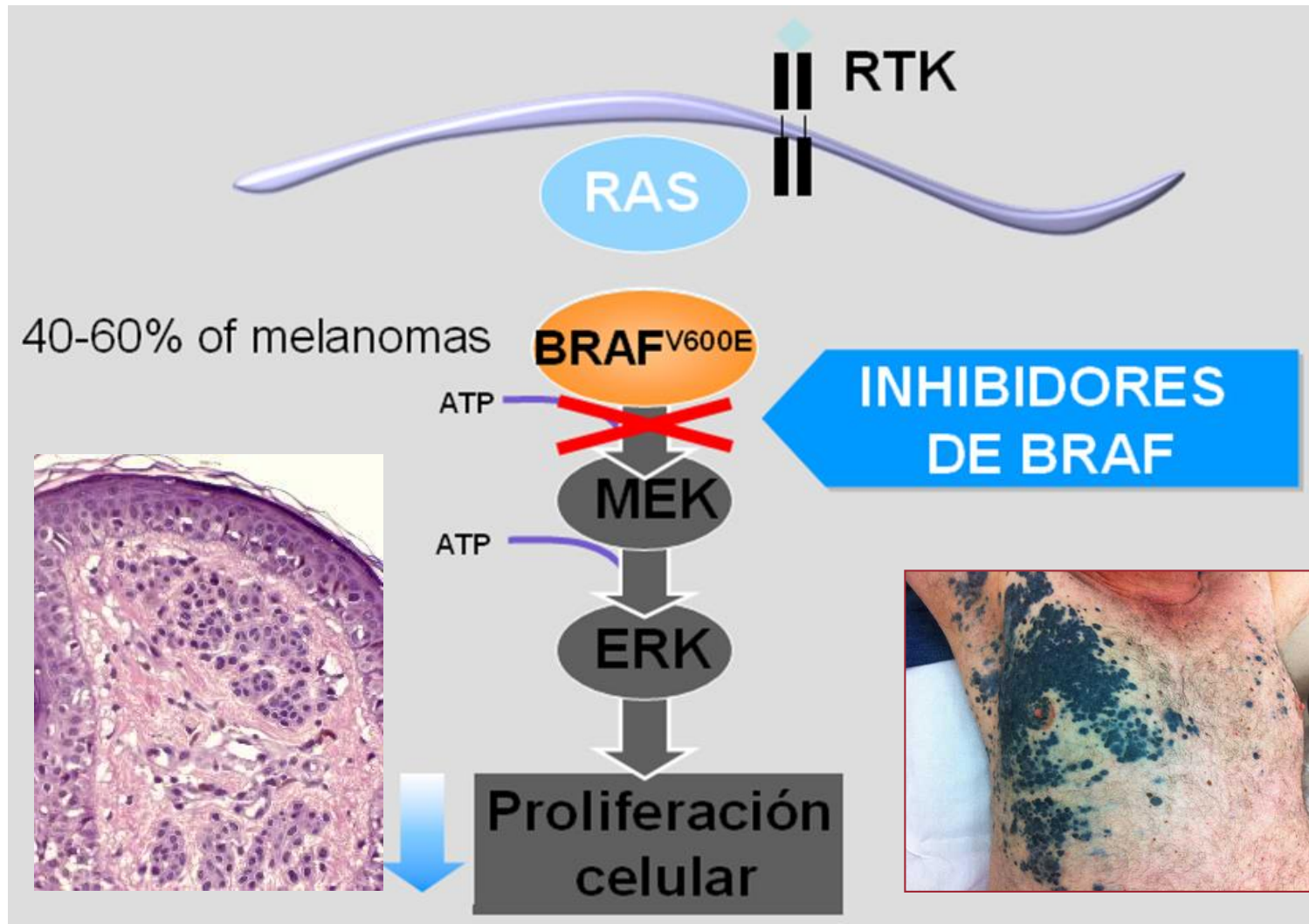
Promueve la
proliferación
celular

- Desarrollo de anticuerpos monoclonales con actividad antitumoral en pacientes BRAF mutados



inhibidores de BRAF

Tratamiento dirigido Mutación BRAF V600E



INHIBIDORES DE BRAF



DABRAFENIB



DEMURAFENIB

Lamentablemente no todos los melanomas presentan la mencionada mutación ya que se encuentra en el 40%-60% de estos tumores, lo que hace imprescindible su determinación

Biomarker Point BRAF

Registro www.biomarkerpoint.es

Enero 2014 (Operativa desde Julio 2012)



202 HOSPITALES NACIONALES REGISTRADOS

✓ Usuarios:

Registrados: 563 procedentes de 202 hospitales nacionales

- 233 usuarios de Oncología Médica
- 330 usuarios de Anatomía Patológica

✓ Muestras:

1037 muestras testadas

- 42% mutación BRAF
- Tasa inválidos: 1%



% mutación BRAF	
And-Can	43%
Noreste	37%
Lev-Bal	49%
Mad-Cen	43%
Norte	39%
Nacional	42%

Zona Norte
88 usuarios
37 hospitales

Zona Cat-Ara
93 usuarios
42 hospitales

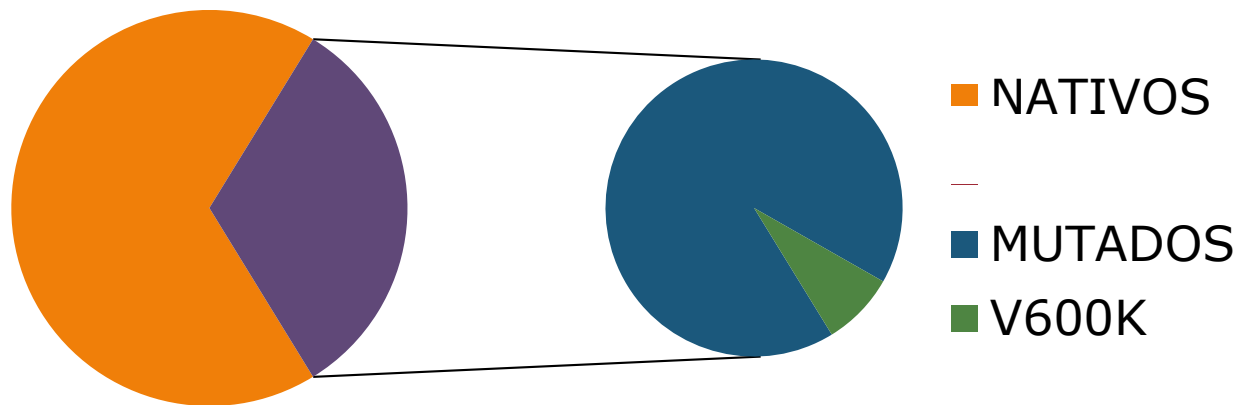
Zona Mad-Cen
154 usuarios
48 hospitales

Zona Lev-Bal
132 usuarios
38 hospitales

Zona And-Can
96 usuarios
37 hospitales



**BRAF MUTADOS: 44 %, la
mayoría de ellos V600E y tan
sólo 2 V600K**





Hospital General Universitario
Santa Lucía

HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO SANTA LUCÍA



SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

Tel. 968 12 86 00 Ext. 951417 / 18

Informe Estudio Molecular

Nº Registro: SL18M0001227

Nº Hª Cª: 766203

Edad: 69

Cama:

Muestra: A B Biopsia por incisión de piel

Datos clínicos y motivo del estudio:

Hospital "Rafael Méndez" (Lorca) (18B-1118).

BRAF.

RESULTADO DEL ESTUDIO MOLECULAR:

BRAF Determinación del estado mutacional V 600 en el gen BRAF:

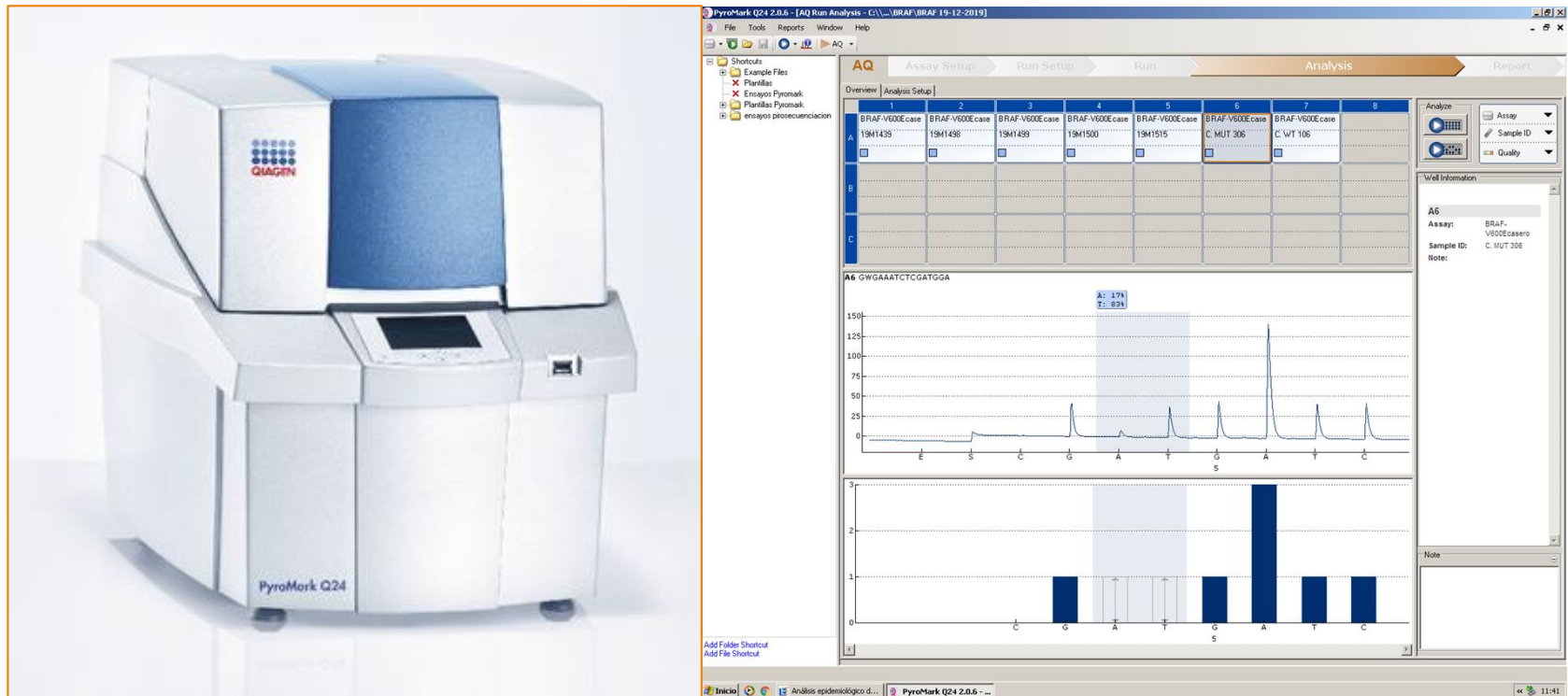
- Cantidad / Calidad: muestra evaluable
- Porcentaje de células tumorales: 60%
- Contenido tumoral: alto ($\geq 50\%$)
- Necrosis tumoral: bajo ($< 50\%$)
- Pigmentación: bajo ($< 10\%$)

RESULTADO: MUTACION NO DETECTADA

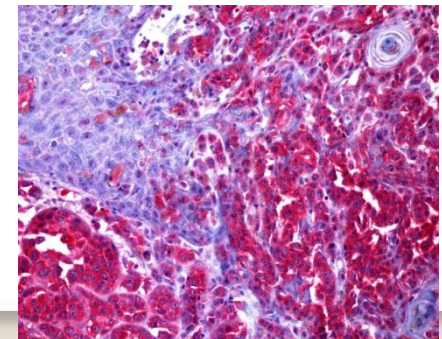
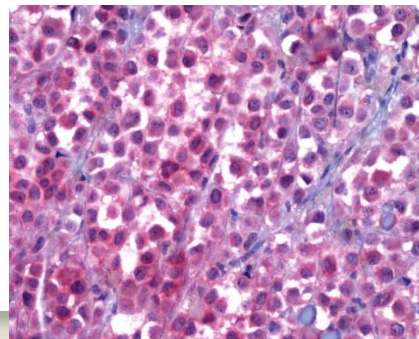
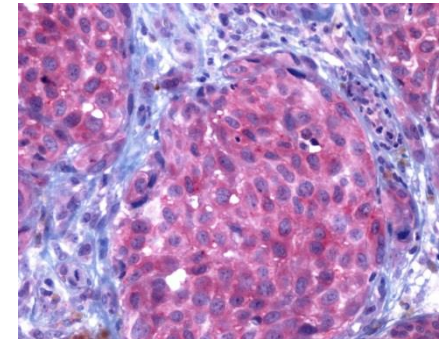
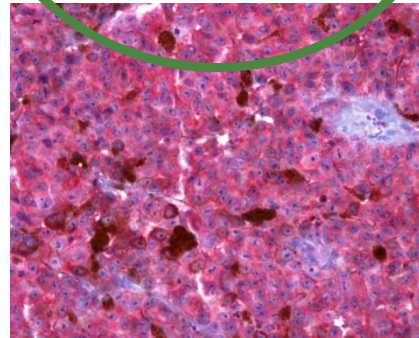
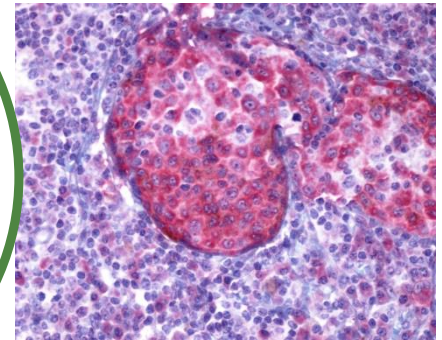
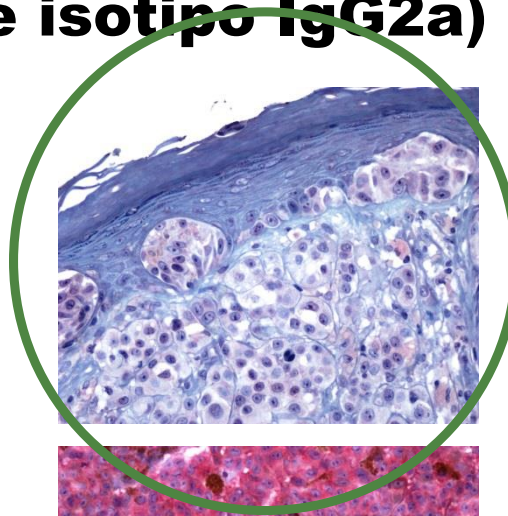
La determinación del estado mutacional del codón 600 del gen BRAF se ha realizado mediante pirosecuenciación en el equipo PyroMark Q24 de Qiagen siguiendo el protocolo descrito en Liu et al. Oral Oncology 62 (2016) 72-77.



Técnicas de biología molecular (mediante la determinación del estado mutacional del codón 600 del gen BRAF mediante pirosecuenciación en el equipo PyroMark Q24 de Quiagen)



Técnicas inmunohistoquímicas (utilizando en anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-BRAF V600E VE1 VENTANA de isotipo IgG2a)



LA CORRELACIÓN DE AMBAS TÉCNICAS ES MUY ELEVADA Y LA FALTA DE LA MISMA SIEMPRE HA TENIDO UNA EXPLICACIÓN EN:

- PREANALÍTICA / CALIDAD DE LA MUESTRA (ESCASO COMPONENTE TUMORAL O ELEVADO PIGMENTO MELÁNICO).**
- INMUNOHISTOQUÍMICA AL NO DISPONER DE ANTICUERPOS PARA LA FRACCIÓN V600K.**

INMUNOHISTOQUÍMICA	MOLECULAR
Preamanalítica sencilla	Preamanalítica compleja
Técnica rápida	Técnica lenta
Sólo detecta V600E	Detecta V600E y otras fracciones como la K
Valoración más subjetiva	Valoración objetiva
Similar sensibilidad y especificidad	Similar sensibilidad y especificidad
Menor coste	Mayor coste
Permite almacenar histología	Almacena ADN
Útil con poca masa tumoral	No útil con poca masa tumoral
Útil con abundante pigmento	No útil en melanomas muy pigmentados
Valoración morfológica	No puede valorarse en el microscopio

**CUANDO REALIZAMOS
INMUNOHISTOQUÍMICA**

```
graph TD; A([CUANDO REALIZAMOS INMUNOHISTOQUÍMICA]) --> B[MOLECULAR NEGATIVA]; A --> C[POCA MUESTRA PIGMENTADA]; A --> D[CONTROL DE CALIDAD];
```

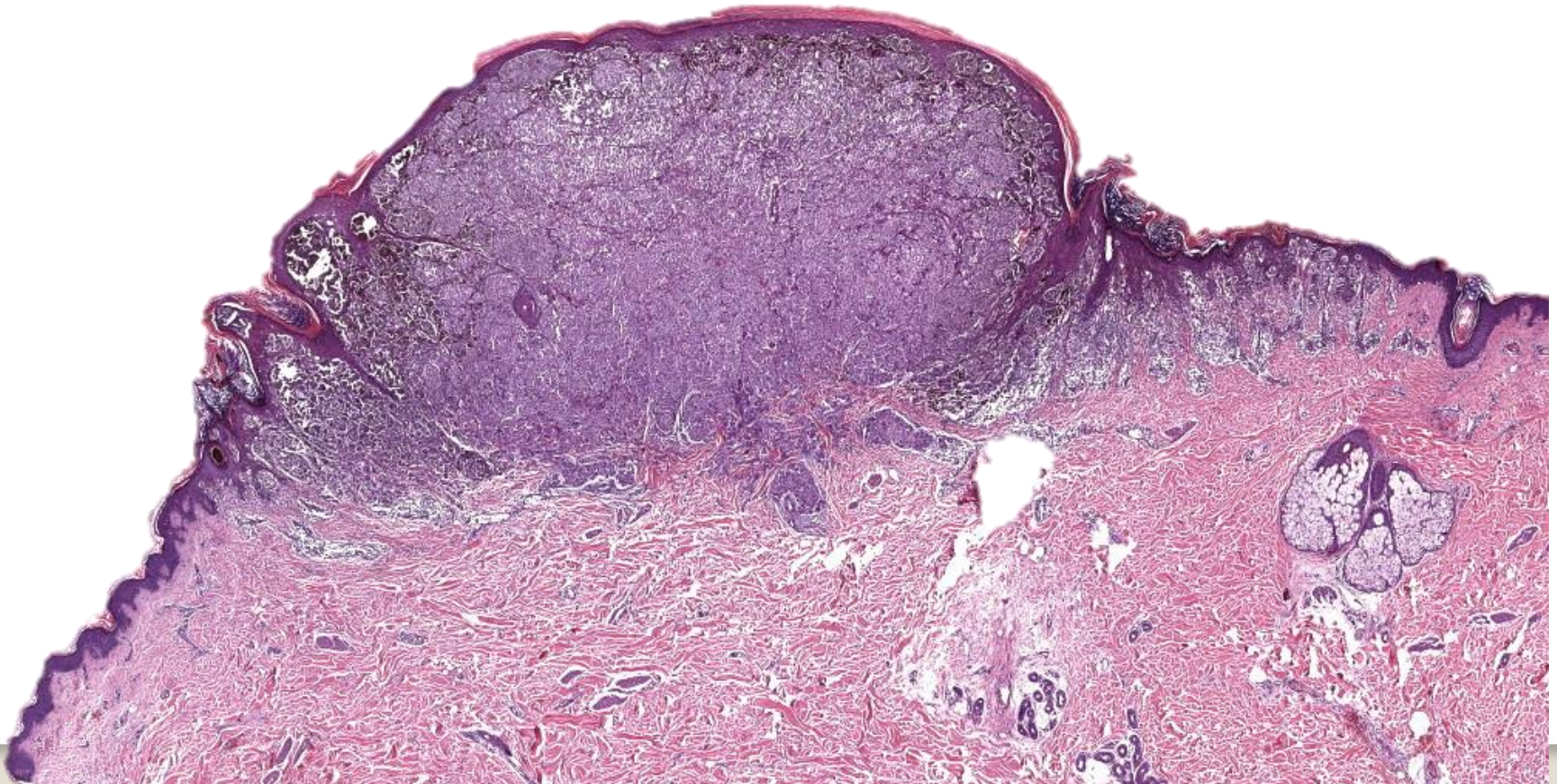
MOLECULAR NEGATIVA

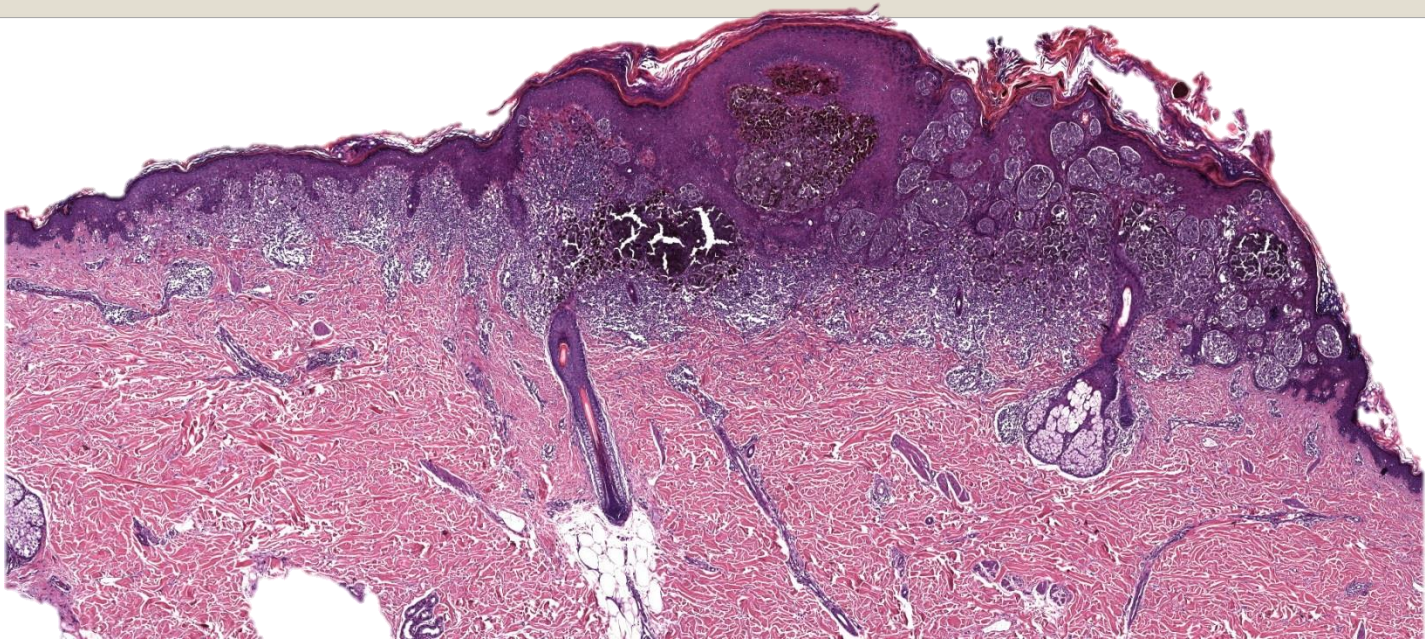
**CONTROL DE
CALIDAD**

**POCA MUESTRA
PIGMENTADA**

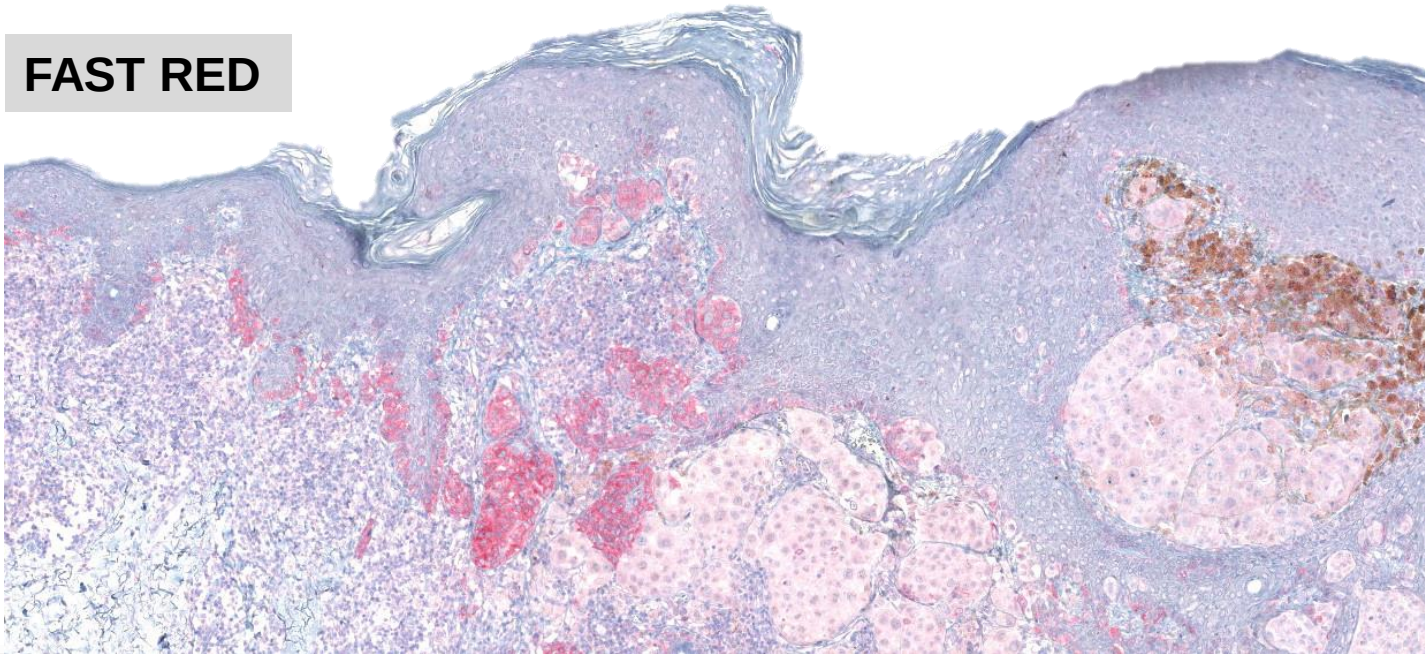
PRESENTAMOS UN CASO EN EL
QUE LA IHQ FUE NECESARIA
PARA EL DIAGNÓSTICO
MUTACIONAL.

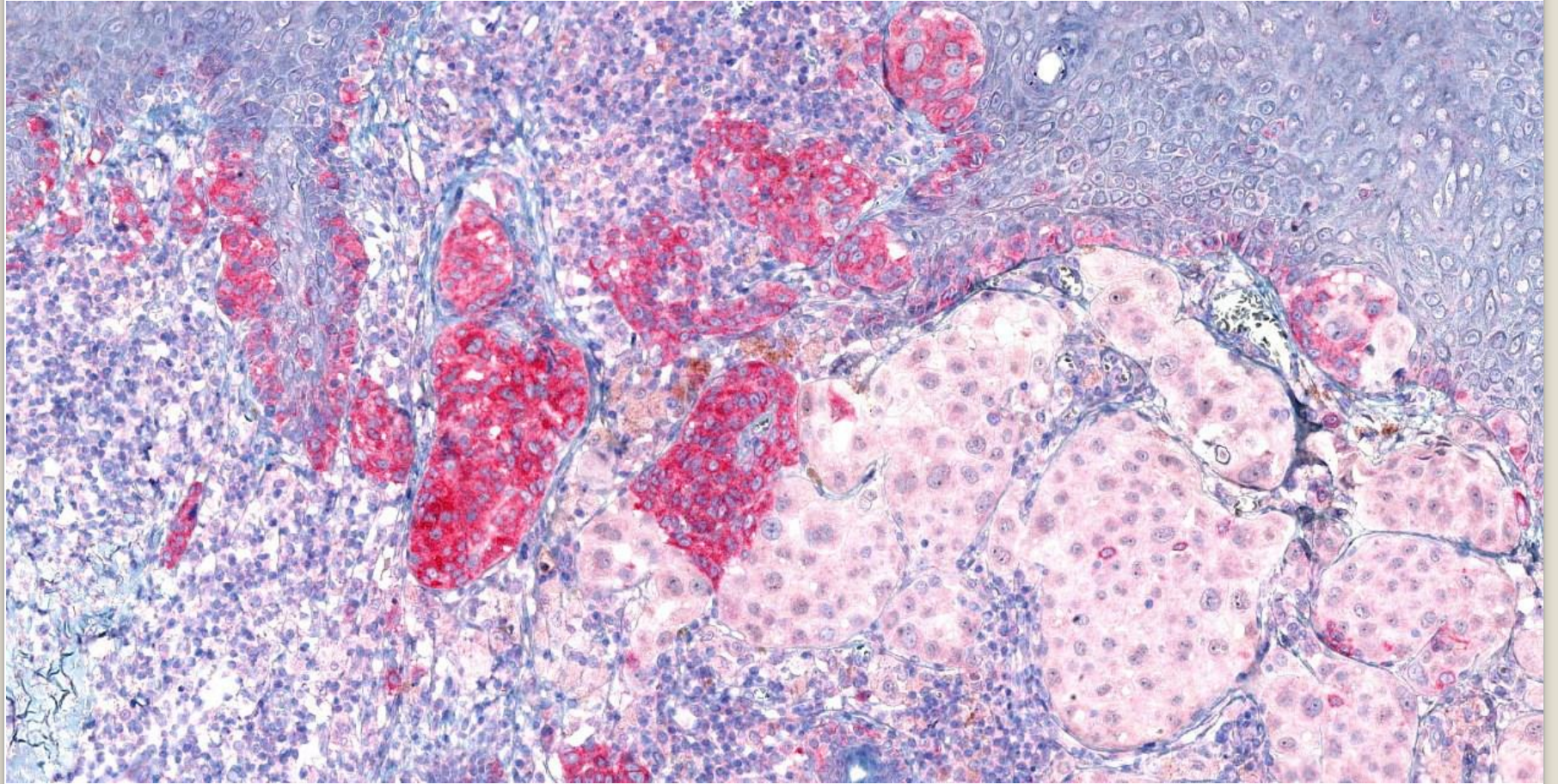
Varón de 32 años.
Melanoma de extensión superficial en
fase de crecimiento vertical.
Localizado en brazo izquierdo.





FAST RED

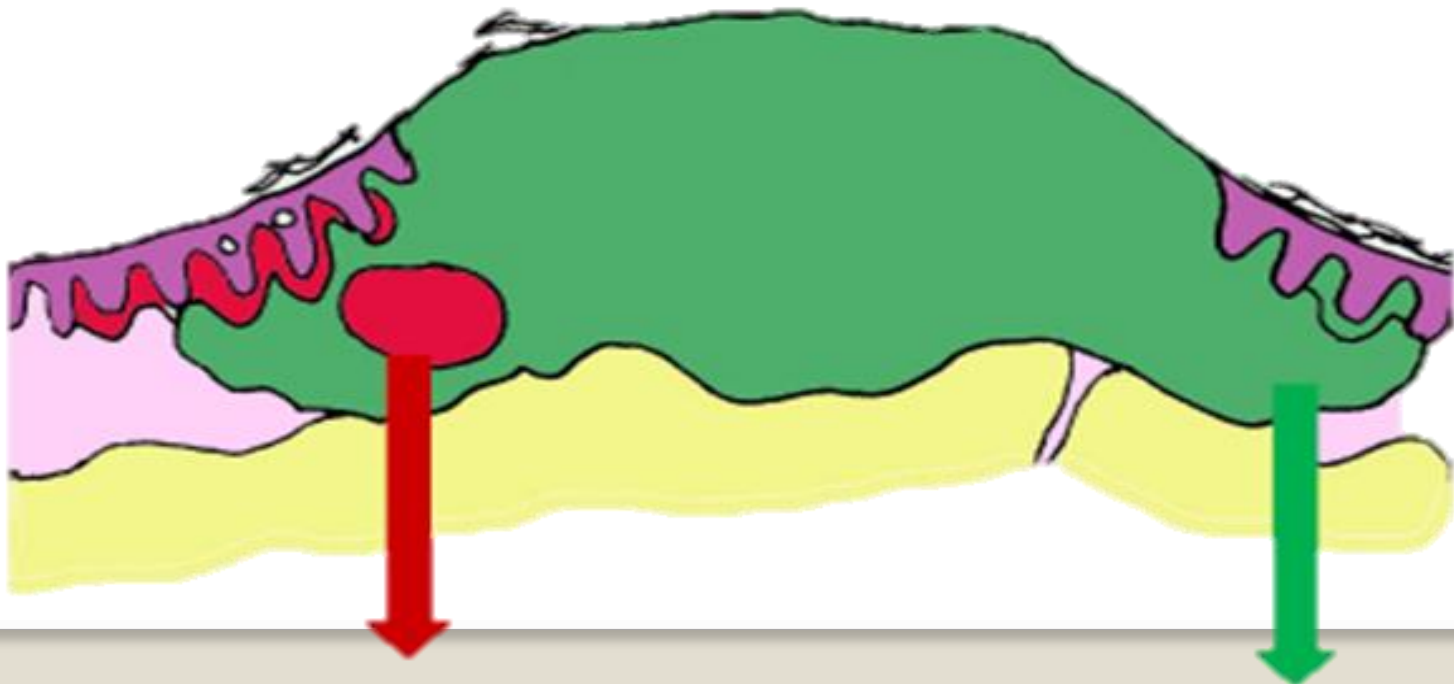
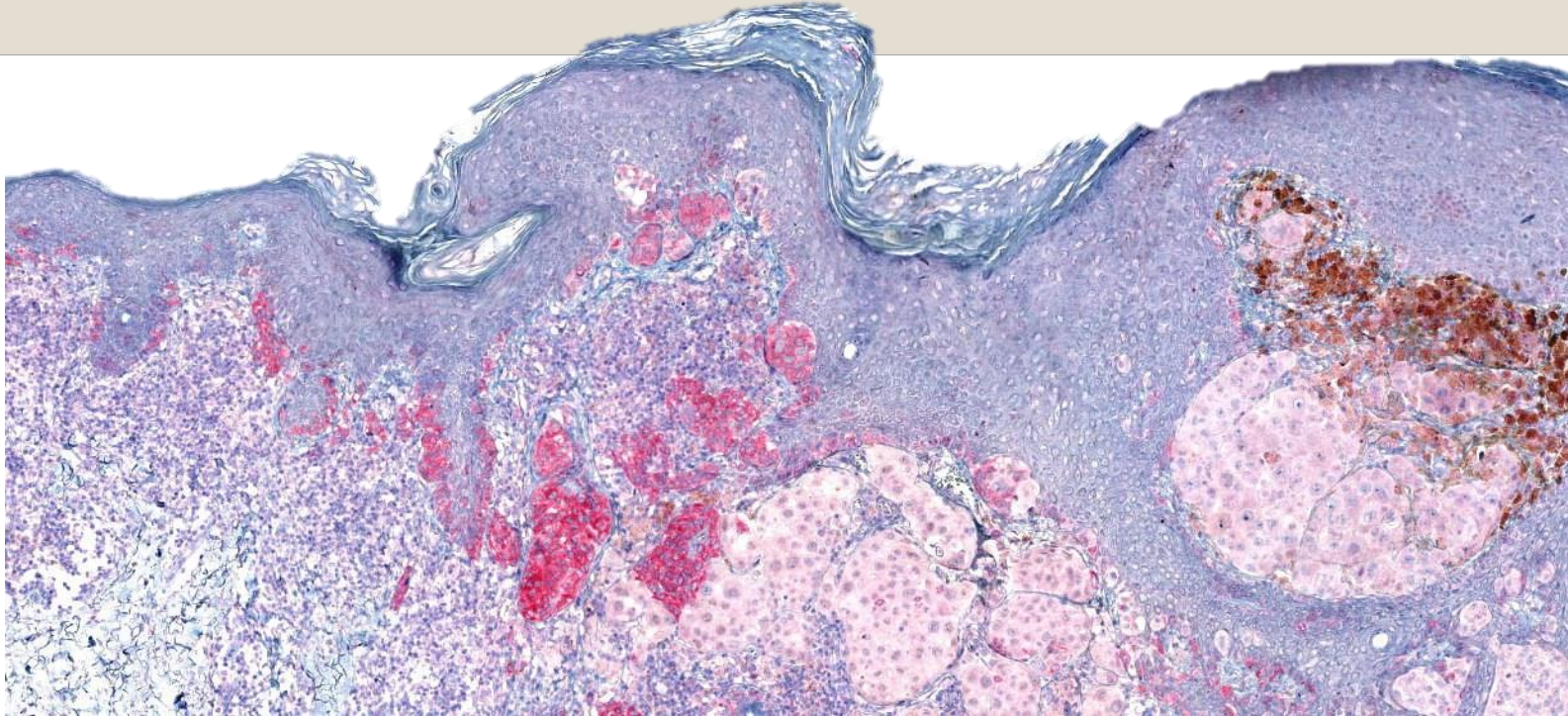


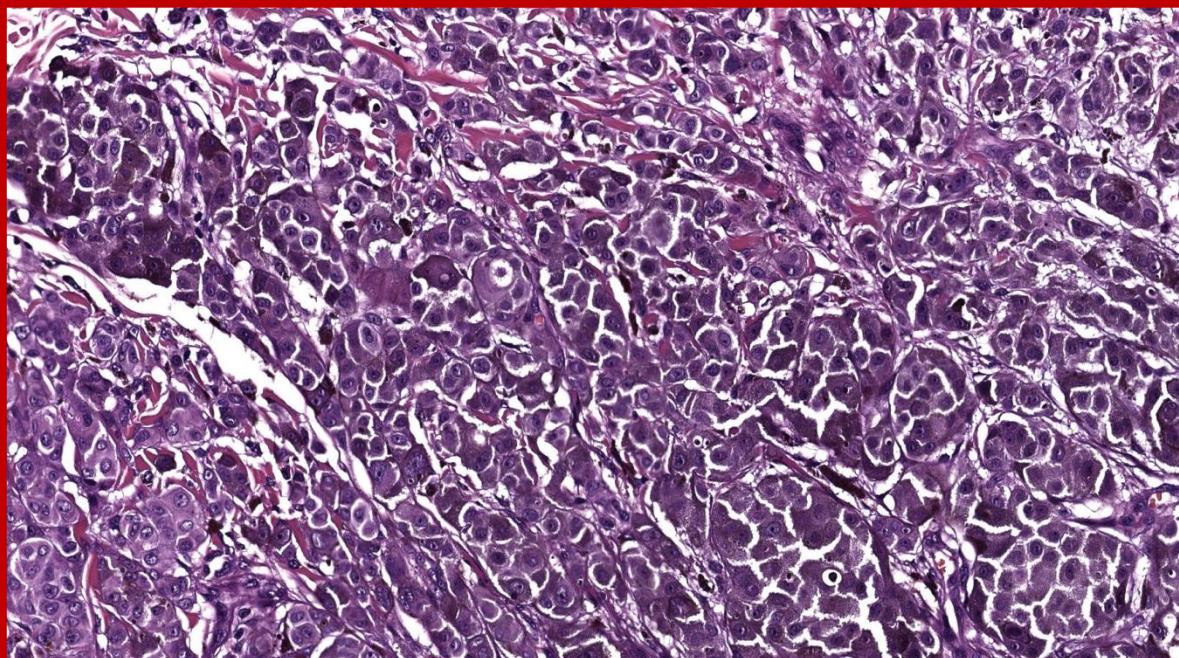
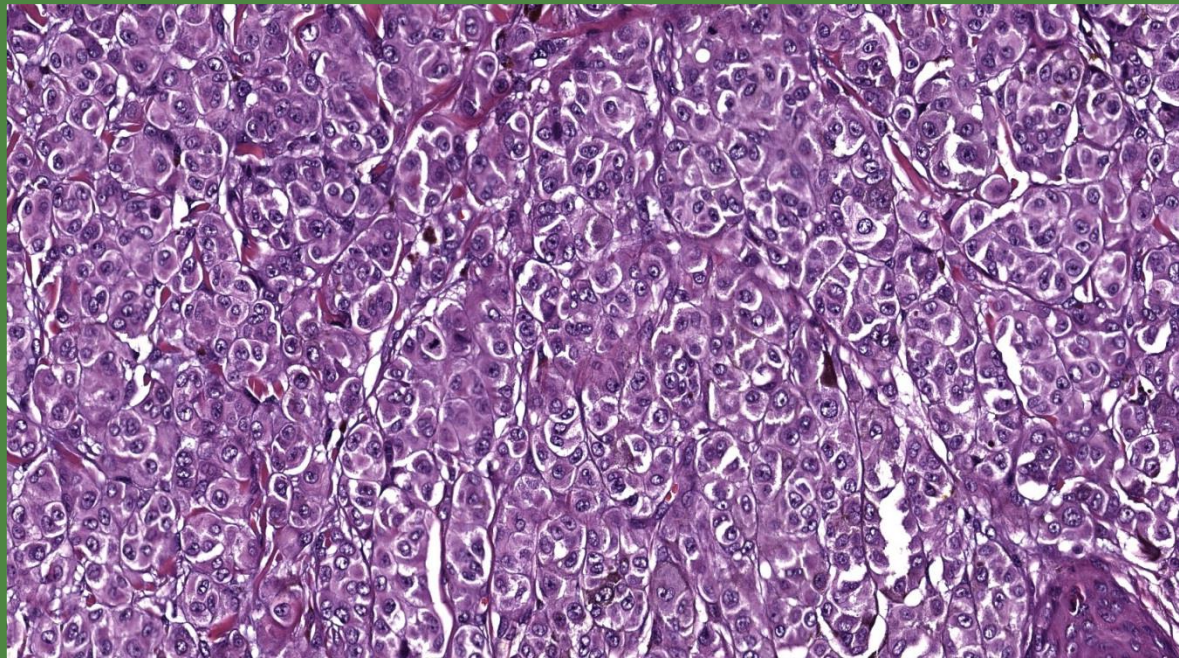




HETEROGENEIDAD TUMORAL

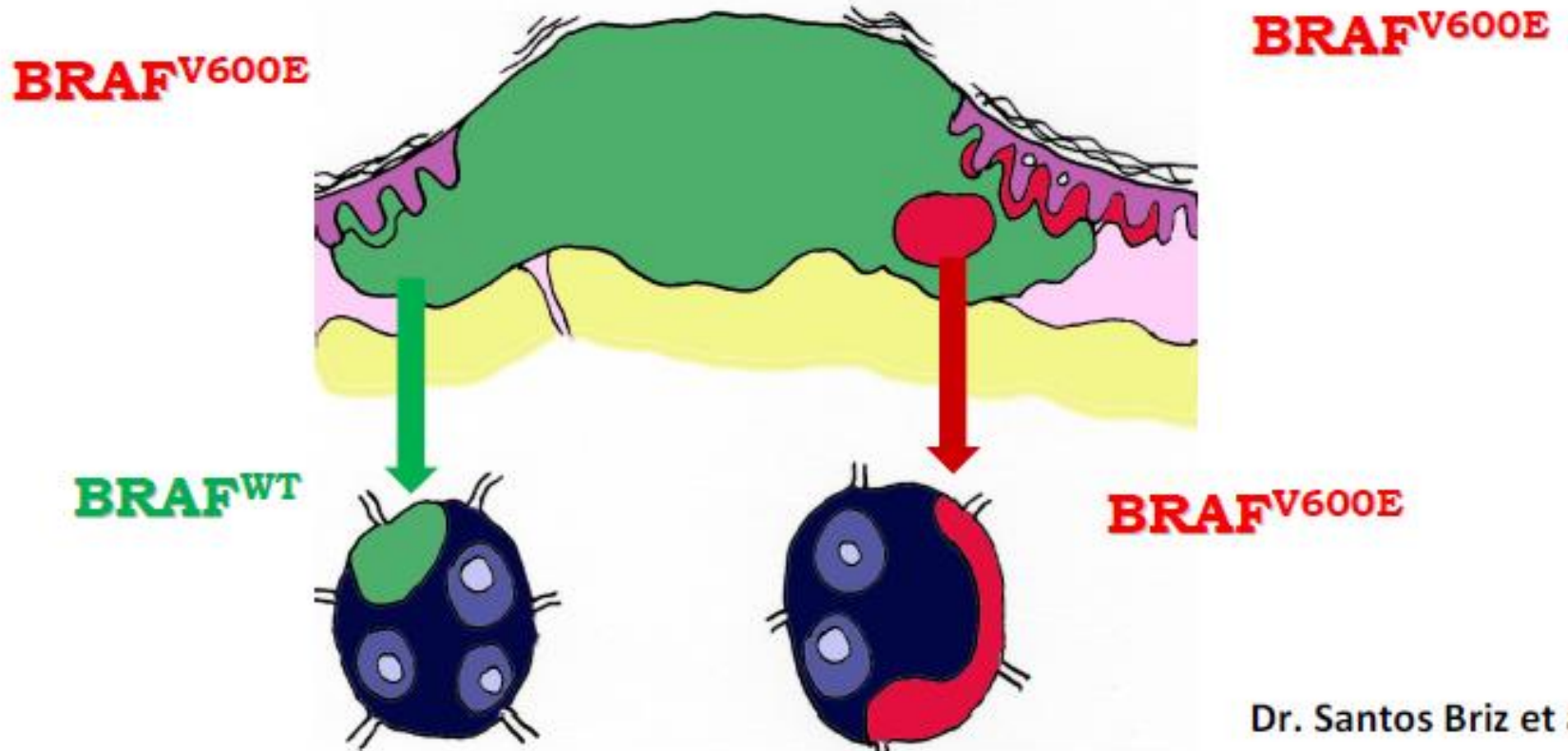
- PÉRDIDA DE EXPRESIÓN.
- ADQUISICIÓN DE NUEVAS
MUTACIONES

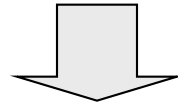




TUMORAL HETEROGENEITY:

- Described in distinct type of tumors
- Policlonal tumors with **BRAF^{WT}** and **BRAF^{V600E}** cells, both with metastatic capacity





ESTUDIO DE LA MUTACIÓN EN LAS METÁSTASIS.

II Conclusiones

USCAP & AACR

*102nd USCAP annual meeting
& Annual meeting AACR 2013*

Dermatopatología

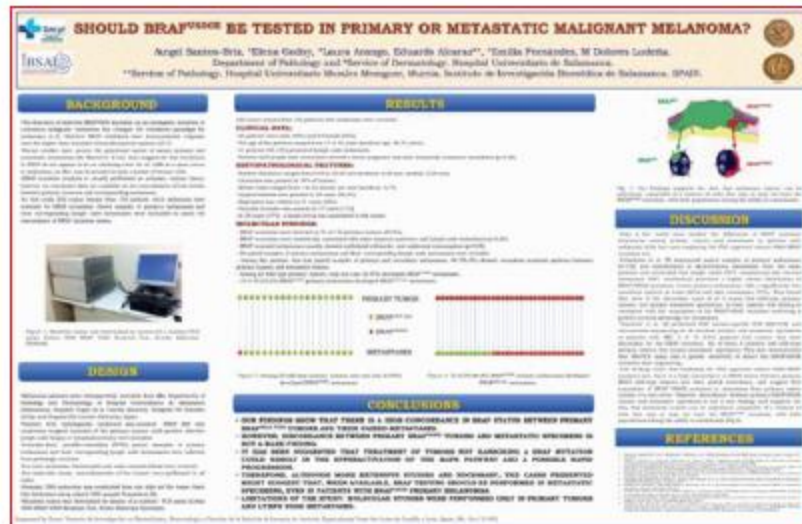
Dr. JOSE LUIS RODRIGUEZ PERALTO
Hospital universitario 12 de octubre. Madrid

Dr. JUAN JOSÉ RIOS MARTÍN
Hospital universitario Virgen Macarena. Sevilla

Dr. ÁNGEL SANTOS BRIZ
Hospital universitario de Salamanca



BRAF y Melanomas

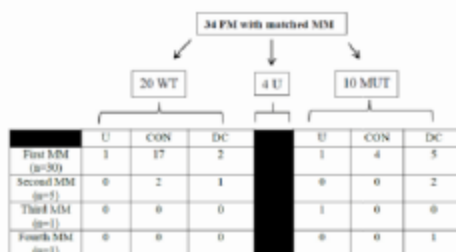


Dr A. Santos Briz y cols.
H. U. Salamanca , España

imagen fondo.jpg

- Estudian 222 melanomas de 152 pacientes
- Determinan BRAF mediante PCR a tiempo real (Cobas) en 60 pacientes con melanomas pareados: primario y metástasis:
 - 46 (76%) concordancia en el BRAF entre primario y metástasis
 - De 22 BRAF nativo en primario, 1 BRAF mutado en su metástasis
 - De 38 mutados en primario, 13 fueron nativos en metástasis

Dr. M. Saorufim y cols.
Beirut, Viena, Weill Cornell NY, Pakistan y
Arabia Saudí

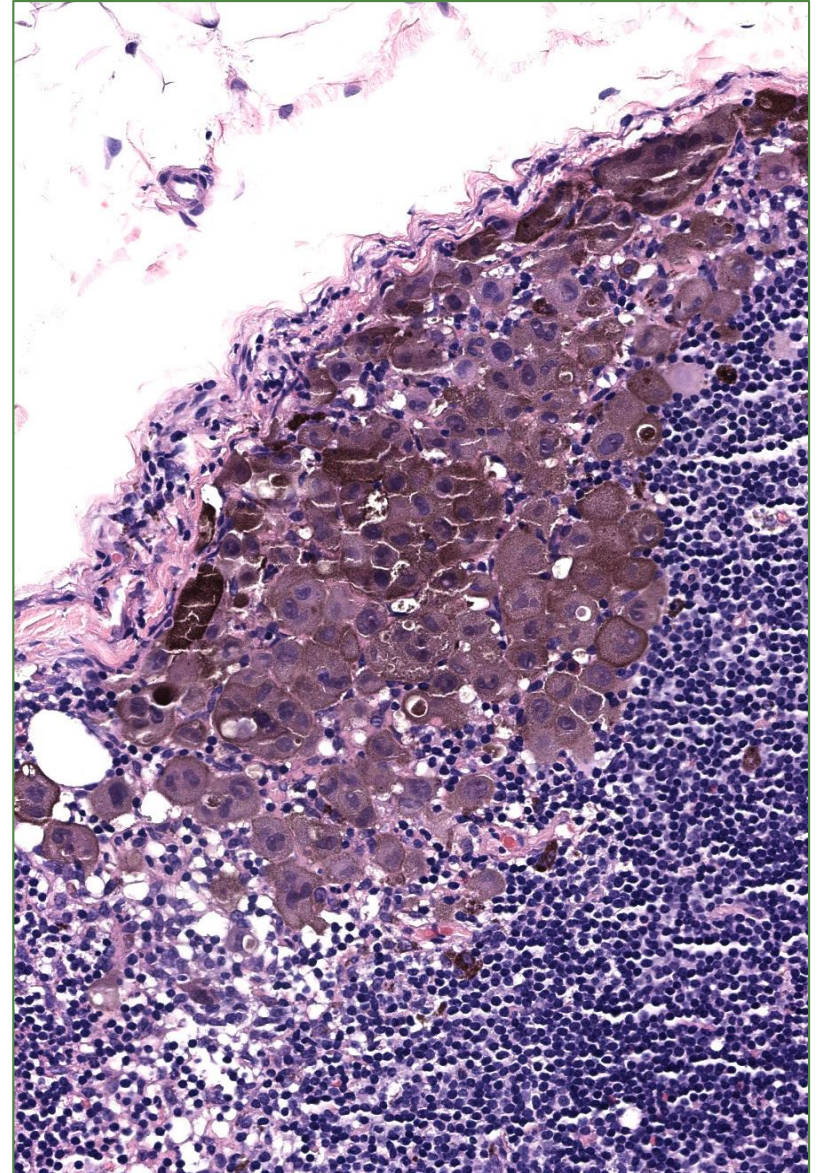
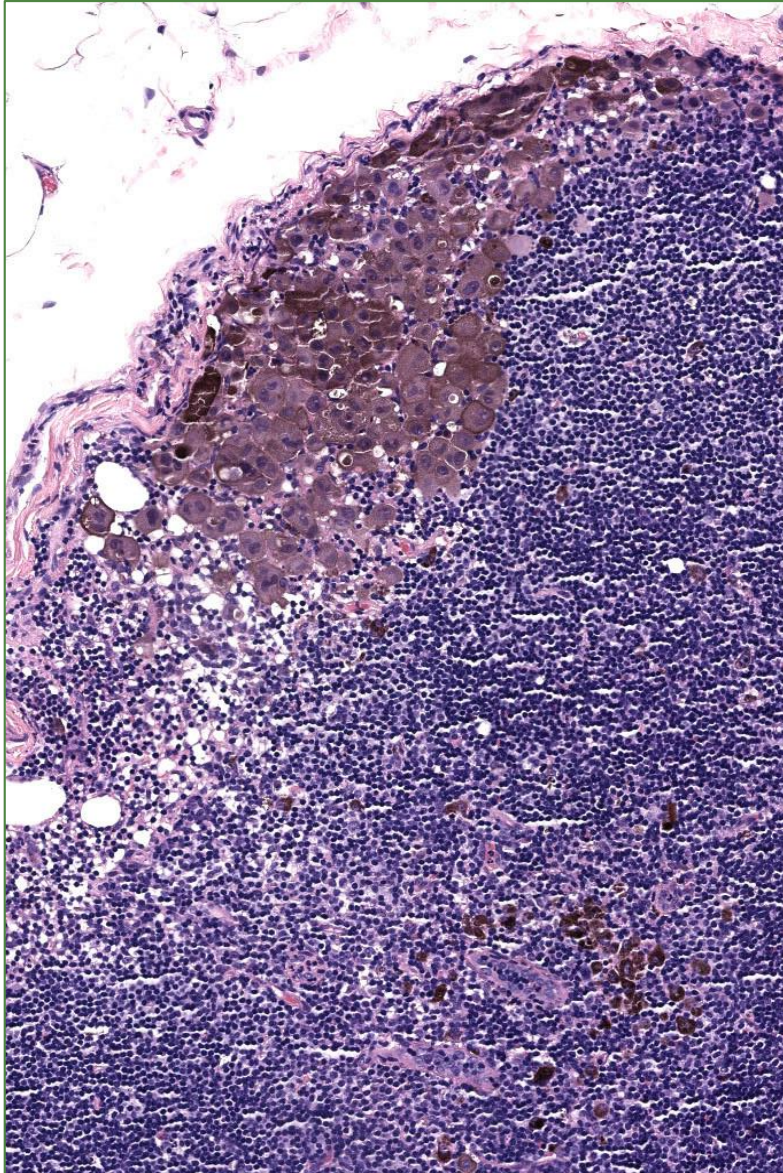
[illegible][illegible][illegible]

PM: Primary melanoma; MM: Metastatic melanoma; U: Unknown BRAF status; WT: Wild type; MUT: Mutant type; CON: Concordant PM-MM BRAF status; DC: Discordant PM-MM BRAF status.

[illegible]

- A high discordant rate (32.3%) implies the need for re-testing of the MM before initiation of BRAF targeted therapy.
- High MM-MM concordance advocates that testing the most accessible metastatic site is sufficient to obtain accurate BRAF mutation status.

- Estudian mutaciones de BRAF en 34 pacientes con melanomas pareados primarios y metástasis:
 - Concordancia 68% (23/34) en el BRAF entre primario y metástasis
 - Discordancia 22% (11/34) en el BRAF entre primario y metástasis
 - De 22 BRAF nativos en primario, 3 (14%) estaban mutados en sus metástasis
 - De 12 BRAF mutados en primario, 8 (67%) fueron nativos en metástasis





ELSEVIER

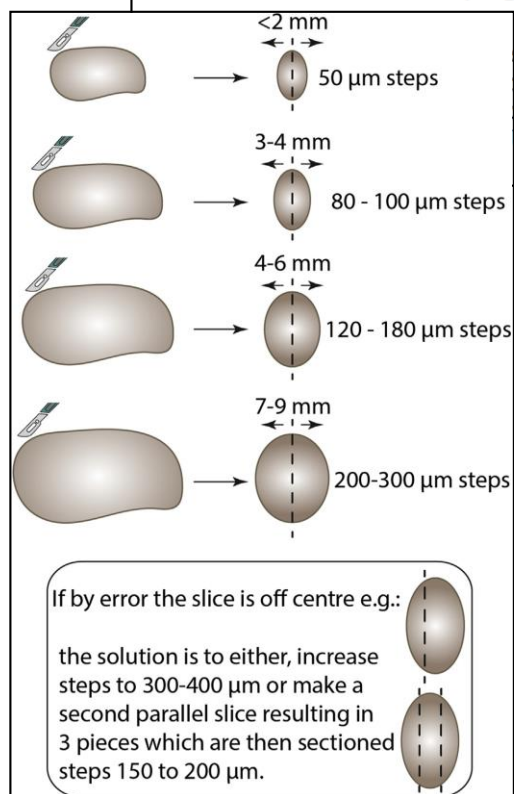
Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.ejancer.com

Current Perspective

An updated European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) protocol for pathological evaluation of sentinel lymph nodes for melanoma



Section	Staining
1	S100
2	Spare
50/300 µm step (+50/300 µm)	
3	H&E
4	S100
5	Spare
6	Spare
7	Spare
50/300 µm step (+100/600 µm)	
8	S100
9	Spare
50/300 µm step (+150/900 µm)	
10	S100
11	Spare
50/300 µm step (+200/1200 µm)	
12	S100
13	Spare
50/300 µm step (+250/1500 µm)	
14	S100
15	Spare

*50 µm for the small lymph nodes of 5 mm or less, 300 µm in lymph nodes of more rounded configuration, i.e. with a short axis length of 9 mm or more.



REVISTA ESPAÑOLA DE
Patología

www.elsevier.es/patologia



REVISIÓN

Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el melanoma metastásico. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica



José Luis Rodríguez-Peralto^{a,*}, Enrique Espinosa^b, Juan José Ríos-Martín^c, Alfonso Berrocal^d, María Dolores Lozano^e, Ana Arance^f, Angel Santos-Briz^g, José Antonio López-Martín^h, María Teresa Fernández-Figuerasⁱ y Salvador Martín-Algarra^j



National Comprehensive
Cancer Network®

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®)

Cutaneous Melanoma

Version 1.2020 — December 19, 2019

NCCN.org

[NCCN Guidelines for Patients®](#)

Continue

Version 1.2020, 12/19/19 © 2019 National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®). All rights reserved. NCCN Guidelines® and this illustration may not be reproduced in any form without the express written permission of NCCN.

• Methods of mutation testing

- ▶ IHC is a technique to selectively visualize antigens (proteins) in tissue section by using antibodies that bind to those specific antigens. IHC may be used to screen for both BRAF V600E and C-KIT. This is an indirect test that detects the mutated protein.
 - ◊ BRAF VE1 (V600E) IHC test may be used as a rapid screening test for assessment of *BRAF* status in melanoma and for potential start of BRAF inhibitor treatment regimen. The sensitivity and the specificity of the VE1 antibody is reported at 89.2% and 96.2%, respectively, with the positive and negative predictive values at 97.1% and 86.2%, respectively. Confirmatory *BRAF* molecular testing is encouraged.^{35,36}
 - ◊ KIT IHC testing may be used as a screening tool for assessment of *KIT* status in acral lentiginous or mucosal melanoma. Due to the wide range of different *KIT* mutations and lack of widespread use of this test, confirmatory *C-KIT* molecular testing is encouraged to avoid false positives or negatives.³⁷
- ▶ NGS, also known as high-throughput sequencing, describes a number of different sequencing technologies that allow sequencing of DNA and RNA much more quickly and cheaply than the previously used Sanger sequencing. Single-gene or small multigene panels are also used in some cases to test either one gene (*BRAF*) or a limited number of genes.

ELECCIÓN DE LA
MUESTRA

PRESENTACIÓN
EN EL COMITÉ DE
TUMORES

PARÁMETROS
MORFOLÓGICOS
PREANALÍTICOS

VALIDACIÓN
DE LOS
RESULTADOS





**HAY RECUERDOS QUE
NUNCA SE OLVIDAN**