

Melanoma: Diagnóstico, evolución y tratamiento bajo una perspectiva molecular

La incidencia de cáncer de piel y particularmente de melanoma se encuentra en franco ascenso debido a la combinación de factores ambientales y socio-culturales. A diferencia de otros tipos de tumores malignos, en la mayoría de los casos la aparición de esta enfermedad y/o sus consecuencias más graves pueden preverse simplemente a través de cambios en nuestras conductas. Fundamentalmente, se recomienda tomar mayores recaudos al exponernos a la radiación ultravioleta y seguir los consejos médicos para la detección precoz de lesiones cutáneas potencialmente peligrosas. El objetivo del presente artículo es proporcionar a los lectores un mayor conocimiento acerca de los distintos aspectos de esta enfermedad, tales como los factores de riesgo, su diagnóstico y pronóstico. También se intenta informar sobre los avances más recientes en el campo de la investigación y como estos descubrimientos están siendo aplicados para mejorar el tratamiento de los pacientes que sufren esta enfermedad.

■ **Maria Elisa Picco,
Natalia Brenda Fernandez,
Pablo López Bergami*.**

Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET), Vuelta de Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina.
* pablobergami@gmail.com

■ LA PIEL Y LOS MELANOCITOS

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano y actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno. Está formada por dos capas principales, la dermis y la epidermis (Fig. 1). La epidermis es la capa más externa de la piel y está compuesta principalmente por queratinocitos y en menor propor-

ción por melanocitos, que dan la pigmentación a la piel. Además se encuentran células del sistema inmune como linfocitos y células de Langerhans. La dermis se encuentra ubicada por debajo de la epidermis y está formada por abundantes fibras de colágeno que le dan a la piel su consistencia y elasticidad característica. La dermis es 20-30 veces más gruesa que la epidermis. En ella se encuentran otros componentes de la piel como pelos, uñas y glándulas sebáceas y sudoríparas [1].

En respuesta a la exposición solar, la piel experimenta una serie de

cambios con el fin de proteger al organismo de la radiación ultravioleta (UV). Una limitada exposición a la luz UV es necesaria para el organismo, por ejemplo para la generación de la forma bioactiva de la vitamina D. Sin embargo, la exposición excesiva resulta perjudicial por su efecto carcinogénico sobre los tejidos y células a ella expuestas. El espectro de radiación UV se divide en tres regiones: UVA (320–400 nm de longitud de onda), UVB (280–320 nm), y UVC (200–280 nm). La radiación UVC es biológicamente irrelevante, ya que es casi completamen-

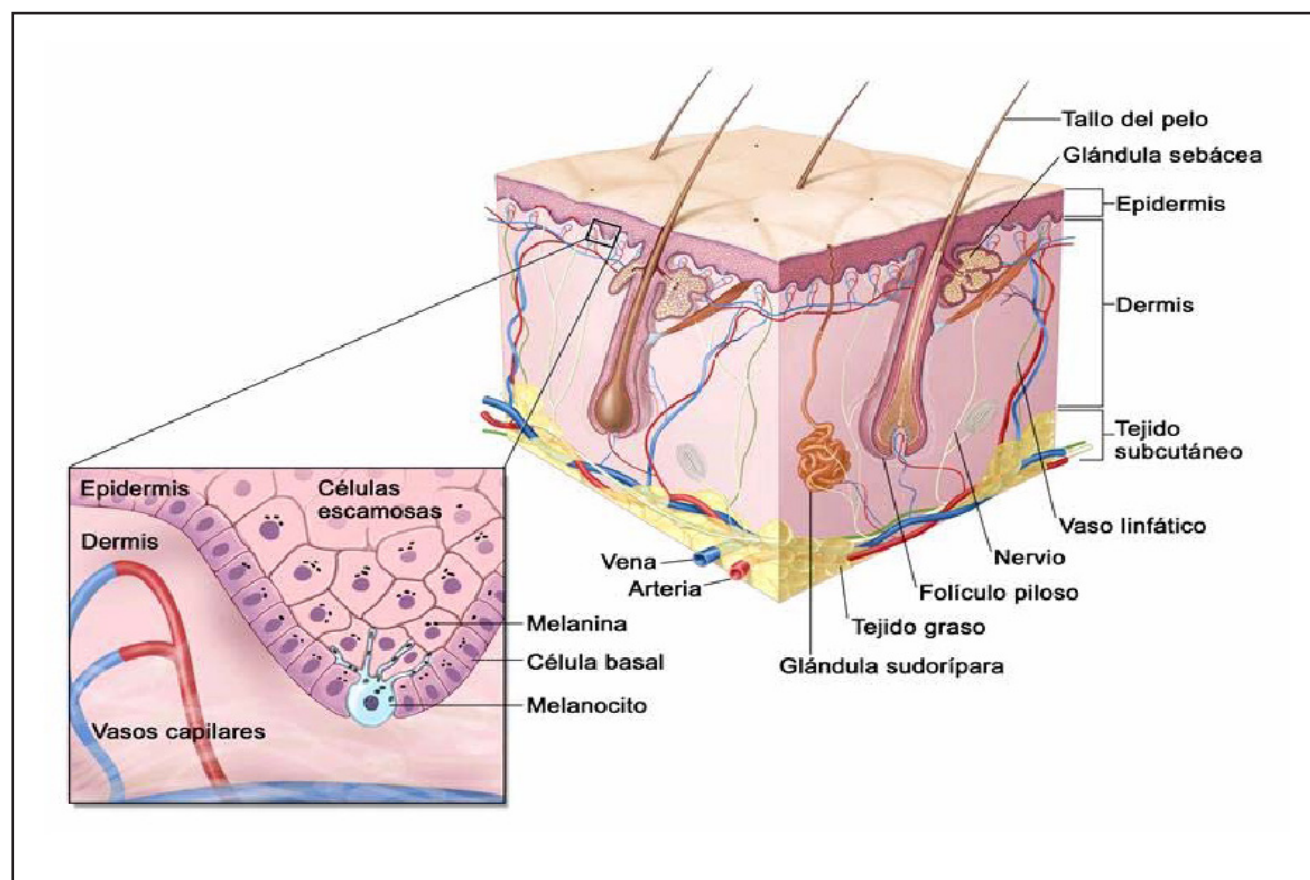


Figura 1: Descripción de la piel y sus capas. Modificado de www.cancer.gov.

te absorbida por la capa de ozono atmosférica. Tanto UVA como UVB llegan a la superficie de la tierra y tienen efectos dañinos sobre el ADN y las proteínas tisulares. La radiación UVB es considerada más peligrosa que la UVA ya que causa dos tipos importantes de lesiones en el ADN: dímeros de pirimidinas (CPD, del inglés: cyclobutane pyrimidine dimers), y fotoproductos 6-4 (6-pirimidina 4-pirimidona). Los CPD son más abundantes y de mayor capacidad carcinogénica que otras lesiones en el ADN, dando origen a mutaciones $C \rightarrow T$ y $CC \rightarrow TT$ (C: Citosina, T: Timidina) [2].

Los melanocitos contribuyen a la protección contra la luz UV mediante la síntesis de un pigmento proteico denominado melanina. La producción de melanina aumenta ante la exposición a la luz UV generando la característica respuesta de bronceado de la piel. La producción de melanina por parte de los melanocitos es regulada por factores secretados por los queratinocitos en

respuesta a la radiación [3]. La melanina es un eficiente fotoprotector ya que absorbe más del 99,9% de la radiación UV y disipa esta energía en forma de calor. De esta forma evita el efecto mutagénico de la radiación UV sobre el ADN y reacciones químicas perjudiciales para el organismo como la producción de radicales libres. Además de preservar a los melanocitos, la melanina también protege a los queratinocitos que captan la melanina de los melanocitos y forman con ella una especie de escudo por sobre su núcleo para proteger su ADN (Fig. 1) [4]. Esto explica porque las personas con enfermedades de la piel como vitiligo y albinismo, caracterizadas por la falta de melanocitos funcionales, son hipersensibles a la luz UV [5].

■ MELANOMA

Debido a la acumulación de alteraciones genéticas heredadas y adquiridas las células de la piel

pueden sufrir procesos de transformación que llevan a la generación del cáncer. Cuando las células que sufren transformación maligna son los melanocitos, el cáncer se denomina melanoma. Los melanocitos se encuentran distribuidos uniformemente en toda la superficie de la piel y su proliferación y diferenciación es controlada estrictamente por los queratinocitos a través de la secreción de distintos factores solubles. La mutación de ciertos genes en los melanocitos les permitirá evadir ese control ejercido por los queratinocitos y proliferar y extenderse formando los lunares (nevus). Estos lunares son generalmente benignos pero pueden eventualmente progresar hacia la formación de un melanoma. Debido a que la mayoría de estas células aún producen melanina, los melanomas a menudo son de color marrón o negro [6].

Dado que los datos oficiales son escasos y deficientes, se desconoce con exactitud cual es la incidencia de melanoma en nuestro país. Por

este motivo, varios profesionales de la salud crearon en 2003 el Registro Argentino de Melanoma Cutáneo (RAMC) que hasta el presente lleva relevados 4100 casos de melanoma.

Debido al origen caucásico de gran parte de nuestra población y a su localización en una similar latitud geográfica es posible basarse en datos estadísticos de países desarrollados como Australia o Estados Unidos. Según la American Cancer Society (ACS) el cáncer de piel es el tercer tipo de enfermedad maligna más prevalente y a diferencia de otros tumores su incidencia continua en franco aumento a una tasa del 3% anual [7]. Si bien, el melanoma es menos común (5%) que otros tipos de cáncer de piel, es la principal causa de muerte por enfermedades de la piel (80%) [6].

Los principales factores de riesgo de melanoma son [6]:

- **Genéticos:** debido a mutaciones predisponentes. Alrededor del 10% de las personas con melanoma tienen un pariente en primer grado con la enfermedad.
- **Edad:** su incidencia aumenta con la edad. Sin embargo, a diferencia de otros tumores, se presenta en todas las edades y es uno de los cánceres más frecuentes en adolescentes y adultos jóvenes. Además, se observa un creciente número de casos pediátricos.
- **Presencia de lunares:** los lunares son tumores benignos de origen melanocítico. Un mayor número de lunares se asocia a mayor riesgo de melanoma. De especial importancia son los lunares congénitos y los atípicos o displásicos. Estos últimos suelen ser mayores a 5 mm de diámetro.
- **Color de piel:** el riesgo de desarrollar melanoma es de alrededor de 1 en 50 para las personas de tez blanca, 1 en 1.000 para las personas de raza negra, y 1 en 200 para las personas de origen indoamericano. Las personas de piel clara, pecosas, rubias y especialmente las personas pelirrojas tienen un mayor riesgo de desarrollar un melanoma.
- **Medioambientales:** relacionados

fundamentalmente a la exposición a radiación ultravioleta (UV) y a su principal fuente: la luz solar. El daño generado por la radiación UV depende de la intensidad de la radiación, la cual está determinada por la ubicación geográfica, la hora y el tiempo de la exposición y el grado de protección (ropa o filtro solar). Las lámparas y cabinas bronceadoras son otra fuente de luz UV.

- **Socioculturales:** se relacionan con el tipo de trabajo de cada individuo: urbano o rural, en exteriores o en interiores, etc. La exposición solar frecuente y regular (por ej, en trabajadores rurales o de exteriores) a menudo involucra un menor riesgo que la exposición intermitente (típica de habitantes de zonas urbanas). El crecimiento de la valoración estética del bronceado de la piel, asociado a un mayor

uso de lámparas bronceadoras se ha convertido en un importante factor de riesgo en las últimas décadas.

En los últimos años distintas evidencias, especialmente el secuenciación del "genoma de melanoma" han confirmado el rol crítico de la radiación UV en la etiología de melanoma. Luego de la secuenciación del genoma humano, varios laboratorios se focalizaron en descifrar el "genoma del cáncer". Para ello se procedió a secuenciar el ADN de células provenientes de distintos tumores. Uno de los primeros en ser descifrado corresponde a una línea celular (Colo-829) extraída de una metástasis de un hombre de 43 años con melanoma. Este análisis demostró que dicha línea celular presenta un elevado número de aberraciones cromosómicas. En particular se de-

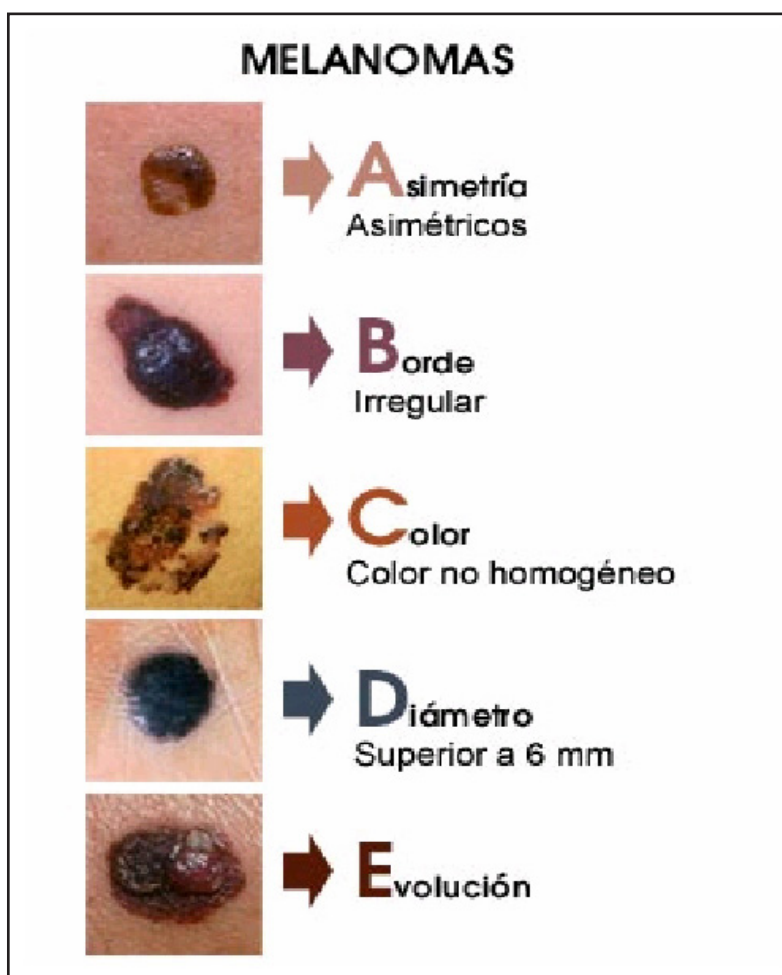


Figura 2: Regla ABCDE para el diagnóstico de melanoma. Tomado de www.elmundo.es.

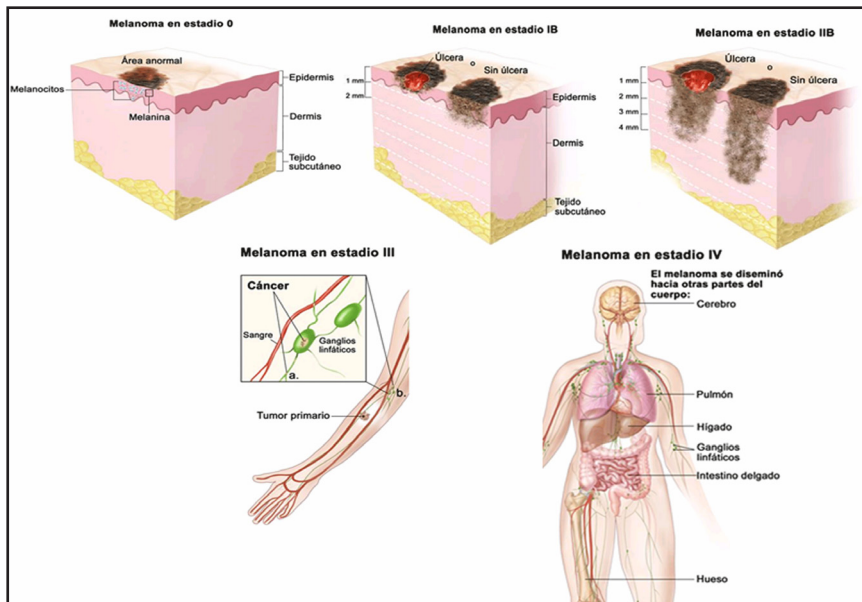


Figura 3. Estadios de melanoma.

En el estadio 0, las células anormales se encuentran solamente en la epidermis. En el estadio I el cáncer se encuentra en la epidermis y/o en la parte superior de la dermis, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos vecinos. El tumor tiene un grosor de menos de 1,5 mm. La sobrevida a 5 años es de 89-95%. En el estadio II el tumor tiene un grosor de 1,5 mm a 4 mm y se ha diseminado a la parte inferior de la dermis, pero no al tejido situado debajo de la piel ni a los ganglios linfáticos vecinos. La sobrevida a 5 años es de 45-77%. El estadio III se caracteriza por su diseminación a las capas más bajas de la piel, la presencia de tumores satélites cercanos al tumor original y la diseminación a los ganglios linfáticos. La sobrevida a 5 años es de 24-69%. En el estadio IV el tumor se ha diseminado a otros órganos o a ganglios linfáticos alejados del tumor original. La sobrevida a 5 años es de 5-20%. La variación en estas cifras se debe a la existencia de sub-estadios (IA, IB, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIB y IIIC). Modificado de www.cancer.gov.

Estadounidense de Oncología) recomienda consultas dermatológicas en forma anual para las personas mayores de 40 años y cada 3 años para las personas de 20-40 años. Aun más importante es la realización de auto exámenes una vez al mes para detectar cualquier cambio sospechoso en la piel. Para hacer más efectivos los auto exámenes se desarrolló el sistema nemotécnico **ABCDE** el cual ayuda a recordar las características que podrían ser síntomas de un melanoma (Fig. 2).

- **Asimetría:** una mitad del área anormal es diferente de la otra mitad.
- **Bordes:** la lesión o el tumor tiene bordes irregulares.
- **Color:** el color cambia de un área a otra, con tonos bronce, café o negro (algunas veces blanco, rojo o azul).
- **Diámetro:** manchas o lunares generalmente, pero no siempre, mayores a 6 mm de diámetro.
- **Evolución:** las características del lunar se modifican con el tiempo.

Cuando existe la sospecha clínica de un melanoma, se recomienda confirmar el diagnóstico a través del estudio histológico luego de la extirpación-biopsia de la lesión. Una vez diagnosticado el melanoma, el análisis histopatológico de la muestra a través del índice de Breslow (medición milimétrica del grosor del tumor) y el nivel de Clark (describe el nivel cutáneo de invasión) permite determinar el grado de evolución de la enfermedad. De esta forma se puede discriminar a los pacientes con enfermedad localizada (estadios I y II), con metástasis ganglionar y regional (estadio III) y con metástasis a distancia (estadio IV). Estos distintos estadios reflejan el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad (Fig. 3)

tectaron 33.345 sustituciones (mutaciones) en su genoma, de las cuales 292 correspondieron a regiones codificantes (exones) de proteínas. Dada la naturaleza de estas mutaciones se dedujo que 187 proteínas se encontrarían afectadas. Interesantemente, la enorme mayoría de las mutaciones halladas fueron C>T/G>A (ver glosario), típicas de las mutaciones inducidas por la luz UV. Este resultado confirma el importante rol de la radiación UV en la generación de melanoma [8].

■ DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE MELANOMA

En aproximadamente el 80% de los casos de melanoma los tumores son detectados en estadios tempranos

lo cual permite resolver la enfermedad mediante extirpación quirúrgica de la/s lesión/s. De no ser detectado en forma temprana, las células de melanoma pueden iniciar el proceso de metástasis que implica la diseminación de las células tumorales en el organismo y la generación de tumores en distintos órganos. El melanoma metastático, como se denomina a esta fase de la enfermedad, cuenta con una muy mala prognosis dada la agresividad de las células de melanoma y la inexistencia de terapias eficaces. La tasa media de supervivencia es de 6 meses y en menos del 5% de los casos se alcanza una supervivencia de 5 años. Por este motivo, el diagnóstico precoz es de fundamental importancia para controlar esta enfermedad. La American Cancer Society (Sociedad

■ CLASIFICACIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO

Otra de las características salientes de melanoma es la heterogeneidad de sus presentaciones

clínicas. Para facilitar su estudio se han propuesto distintos tipos de clasificaciones. Algunas se basan en diversos parámetros histológicos y otras en los estadios de avance tumoral, como se describió más arriba. Recientemente se ha propuesto incorporar datos moleculares a las clasificaciones existentes [7]. La clasificación actualmente más utilizada para melanoma está basada en una combinación entre el patrón histológico adoptado por la WHO (World Health Organization) y el grado de avance de la enfermedad establecido por la AJCC (The American Joint Committee on Cancer) [9]. Esta clasificación define 4 subtipos de melanoma cutáneo [7]:

Melanoma Superficial Difuso (SSM, Superficial Spreading Melanoma), representa aproximadamente el 70% de todos los melanomas. En estadios tempranos aparece como una lesión que puede presentar una gran heterogeneidad cromática que se extiende rápidamente en forma radial sobre la piel. Generalmente se produce en zonas con exposición intermitente al sol (espalda y extremidades) y con una alta densidad de lunares. Suele evolucionar a partir de lunares que crecen lentamente durante 1-5 años.

Melanoma Lentigo Maligno (LMM, Lentigo Maligna Melanoma), representa el 10% de todos los melanomas. Se observa en zonas de exposición crónica al sol (frecuentemente la cara) y predomina en personas mayores a 60 años. Se sospecha que es el resultado del efecto acumulado de la radiación UV. Suele presentarse como manchas aplanadas marrones en la piel de bordes irregulares que crecen muy lentamente durante 5-15 años. Puede confundirse con las manchas solares que aparecen en la piel como resultado de décadas de exposición solar. La aparición de nódulos indica la penetración del tumor en capas más profundas de la piel.

Melanoma Lentigo Acral (AML, Acral Lentigo Melanoma), es poco frecuente en la población caucásica (5%) pero representa el 50% de los melanomas diagnosticados en

indoamericanos, negros y asiáticos. Principalmente aparece en zonas de la piel poco expuestas a radiación solar como palmas de las manos y plantas de los pies y mucosas (nariz, boca, genitales).

Melanoma Maligno Nodular (NMM, Nodular Malignant Melanoma), representa el 15% de todos los melanomas. Es la forma más agresiva de melanoma ya que tiende a crecer más en sentido vertical que horizontal sobre la piel. Suele originarse independientemente de los lunares y las lesiones a menudo presentan úlceras y sangrado.

■ EVENTOS MOLECULARES EN LA PROGRESIÓN DE MELANOMA

En 1984, Clark y colaboradores propusieron un modelo que describe los cambios histológicos que acompañan la progresión gradual de los melanocitos normales a melanoma (Fig. 4) [10]. Este modelo comienza con una población clonal de melanocitos que han proliferado aberrantemente y formado una lesión hiperplásica que no progresa debido a que las células ingresan en un período de senescencia. Cuando se supera la senescencia, el lunar suele presentar un crecimiento displásico y puede eventualmente progresar hacia una etapa de expansión superficial o Fase de Crecimiento Radial (RGP, Radial Growth Phase) que está confinada a la epidermis y tiene un bajo potencial invasivo. Finalmente estas células adquieren la habilidad de invadir la dermis (Fase de Crecimiento Vertical, Vertical Growth Phase o VGP) y de formar metástasis [6]. De esta manera, cada una de las fases está caracterizada por un nuevo clon de células que posee ventajas de crecimiento en comparación con su entorno. El crecimiento vertical suele seguir al radial, aunque a veces ocurre desde el inicio, como en el caso del melanoma nodular, donde casi no existe crecimiento radial, por lo que entraña un peor pronóstico [6].

A diferencia de la clasificación descripta más arriba, el modelo de

Clark brinda un marco teórico más adecuado para estudiar la enfermedad ya que en la actualidad, se sabe que muchos de los cambios histológicos descritos en el modelo se relacionan con alteraciones genéticas particulares que afectan la señalización celular del melanocito, contribuyendo a la transformación y desarrollo tumoral. Estos eventos pueden ser genéticos: cambios en la secuencia de ADN (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, translocaciones o amplificaciones); o epigenéticos (cambios en la metilación del ADN o en la acetilación de histonas, que modifican la transcripción de los genes Fig. 4). No todos los melanomas muestran los mismos eventos, pero algunos son más comunes que otros. Las alteraciones genéticas de mayor frecuencia en melanoma se detallan en la Tabla I [6, 11].

■ FORMACIÓN DEL NEVO BENIGNO

En el modelo de Clark, el primer cambio fenotípico en los melanocitos es la formación de un lunar benigno. En los melanocitos que forman el lunar, el control del crecimiento se encuentra alterado debido a la activación constitutiva de la vía de señalización de las MAP Quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPK). La activación de esta vía estimula la proliferación de los melanocitos pero a su vez induce un mecanismo de senescencia (senescencia inducida por estrés oncogénico) que limita el crecimiento del lunar [12]. Sólo algunos de estos lunares progresarán eventualmente hasta formar un cáncer.

Vía de las MAPK

La vía de señalización de las MAPK regula comportamientos celulares vitales como la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis (Fig. 5) [13]. En células normales, estas funciones son reguladas por ligandos extracelulares, como factores de crecimiento, moléculas de adhesión y factores de

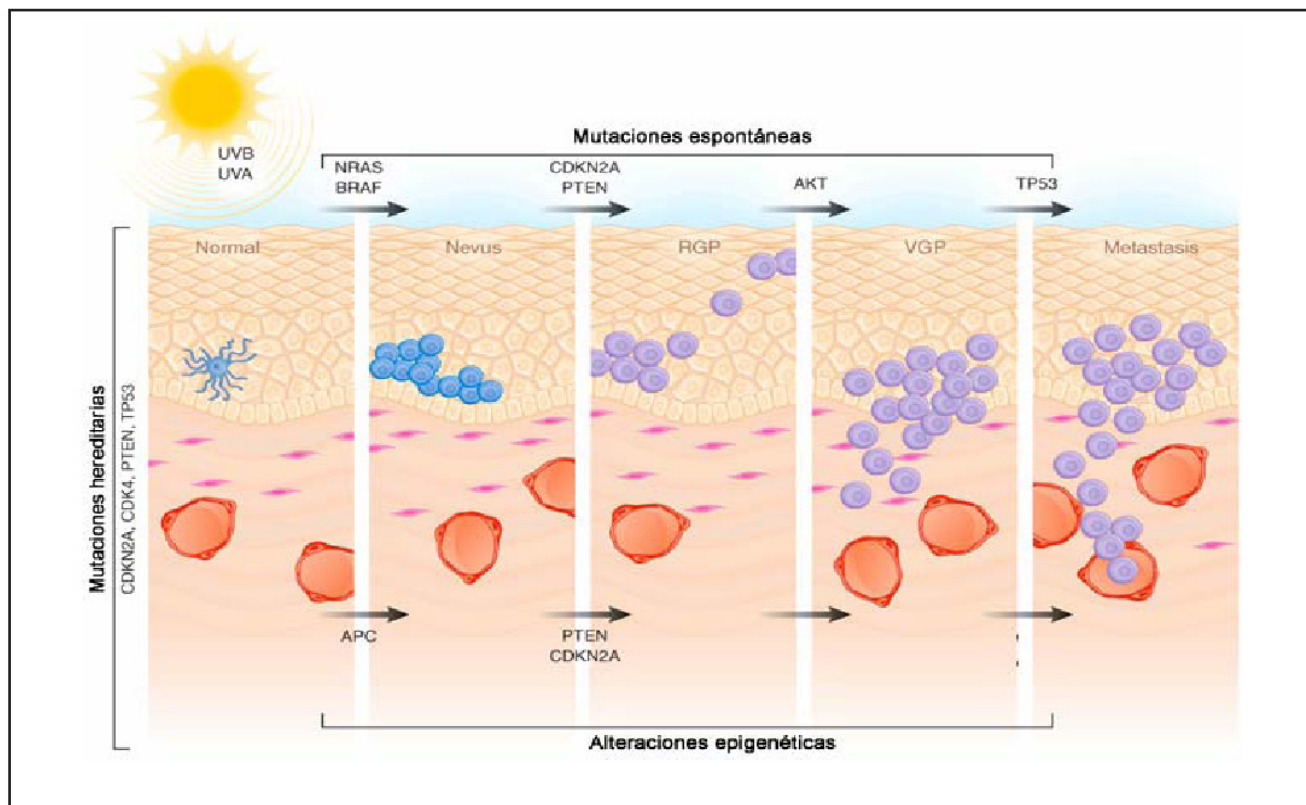


Figura 4. La progresión de melanoma.

Se indican los cambios genéticos (mutaciones) y epigenéticos que tienen lugar durante la progresión de melanoma, dando lugar a las distintas fases de crecimiento. Ciertas mutaciones pueden presentarse en forma congénita, incrementando la probabilidad de desarrollar melanoma y/o posibilitando el desarrollo de melanoma a edades más tempranas. Más detalles en el texto. APC: Adenomatous polyposis coli. Modificado de Zaidi y col. [19].

diferenciación. Estos factores extracelulares se unen a sus receptores en la membrana de las células, activándolos. A continuación, proteínas adaptadoras (por ej. Grb2) unidas al

receptor transmiten la activación a otras proteínas que activan a GTPasas (guanosina trifosfatasa o hidrolasas de GTP) de la familia RAS. Las proteínas RAS se unen a quinasas de

la familia RAF (formada por ARAF, BRAF y CRAF en mamíferos), activándolas e iniciando una cascada de fosforilaciones. RAF fosforila y activa a MEK, una proteína quinasa dual (serina/treonina y tirosina), que a su vez fosforila a ERK (Extracelular signal –Regulated Kinase). ERK es la quinasa efectora de la cascada y tiene más de 50 sustratos citoplásmicos y nucleares, incluyendo varios factores de transcripción como c-Myc, c-Fos, Mitf, ETS y Hif1α entre otros [14]. Estos, afectarán la expresión de numerosos genes, los cuales a su vez serán los responsables directos de modificar los procesos celulares regulados por la vía de las MAPK.

En la mayoría de los melanomas, la vía MAPK se encuentra activa como resultado de mutaciones en BRAF, presentes en 50-70% de los melanomas, o en NRAS, en aproximadamente el 10-15% de estos tumores. Interesantemente, las mutaciones en NRAS y en BRAF son mu-

Tabla I. Alteraciones genéticas frecuentes en melanoma+.

Gen	Frecuencia*	Tipo
BRAF	50-70%	Mutación (Activación)
NRAS	15-30%	Mutación (Activación)
Akt3	43-60%	Sobreexpresión
CDKN2A	40-80%	Delección, mutación, metilación
PTEN	10-30%	Mutación o delección
APAF-1	40%	Metilación
p53	10%	Delección o mutación
Ciclina D1	6-44%	Amplificación
CDKN2B	36%	Delección
β-catenina	6%	Mutación (Activación)
Retinoblastoma	6%	Mutación
Mitf	6-16%	Amplificación

+Adaptado de Bennet, 2008 y Gray-Schopfer y col, 2007.

* Los distintos valores se deben a observaciones de distintos laboratorios o a la utilización de distintos tipos de muestras.

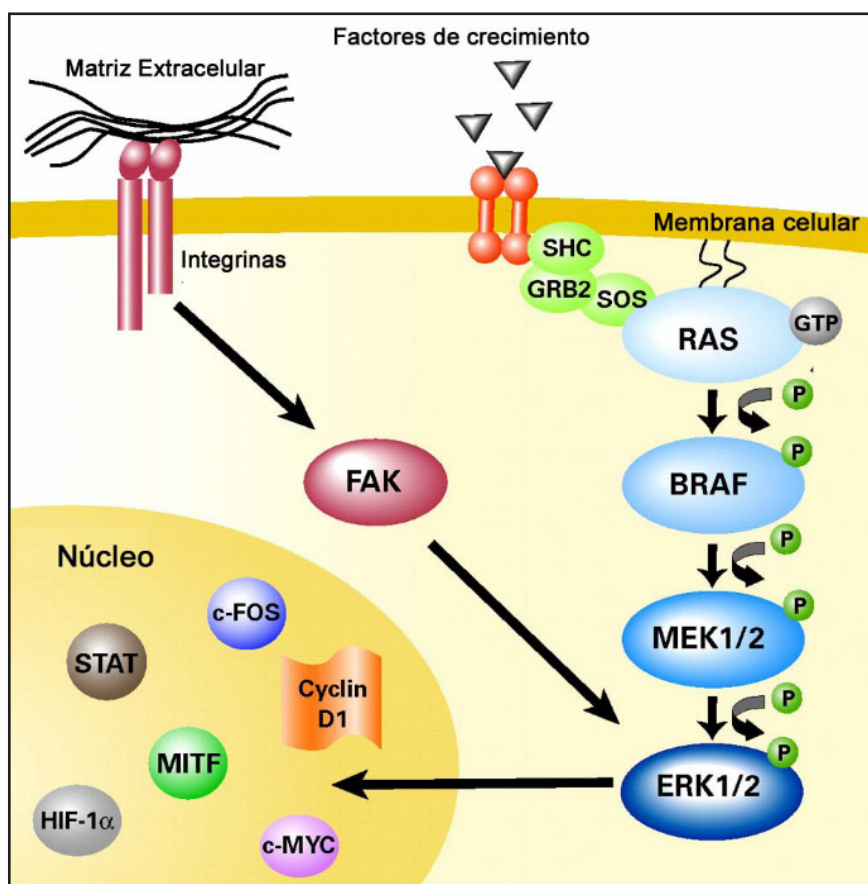


Figura 5. La vía de las MAPK.

Esta vía comprende las proteínas BRAF, MEK1/2 y ERK1/2. En células normales la estimulación de la célula por factores de crecimiento activa a receptores y a moléculas asociadas (SHC, GRB2, etc). La activación es transmitida a la proteína Ras que a su vez activa a las MAPK resultando en la fosforilación de numerosos efectores (por ej. STAT, MITF, etc). Las proteínas Ras y BRAF se encuentran usualmente activadas en melanoma. Adaptado de Fecher y colaboradores [4].

tuamente excluyentes, es decir que no se presentan simultáneamente en el mismo paciente [15-17]. En ambos casos estas mutaciones producen una activación similar de la vía de las MAPK. Las mutaciones en NRAS afectan preferentemente los codones 12 y 61 mientras que en el 90% de las mutaciones en BRAF se observa la sustitución T1799A en el exón 15 que genera un cambio de Acido Glutámico por Valina en el codón 600 (mutación denominada V600E) de la proteína. En estos casos, BRAF exhibe una estructura tridimensional diferente, similar a la que presentan las proteínas no mutadas luego de ser activadas por fosforilación y una elevada actividad catalítica. Más importante aún es el hecho de que esta proteína mutada no responde a los mecanismos de

control que normalmente regulan la actividad de las MAPK. Esta elevada y descontrolada actividad de MAPK se denomina constitutiva y es una característica distintiva en el melanoma.

Luego del descubrimiento de la alta prevalencia de la mutación V600E en melanoma, varios estudios confirmaron que la activación de esta proteína está involucrada en el desarrollo de dicha patología. Se determinó, por ejemplo que BRAF V600E posibilita la formación de tumores de melanoma humano en ratones y que su inhibición disminuye su crecimiento, aumenta la apoptosis e inhibe el desarrollo de tumores de melanoma implantados en ratones atímicos (ratones que posibilitan el establecimiento de tumores, denominados xenotransplantes, por

carecer de un sistema inmune funcional). Es importante destacar que las mutaciones en BRAF se observan con frecuencia similar en lunares y en melanomas primarios y metastáticos [18]. Esto sugiere que las mutaciones de BRAF son un evento temprano en el desarrollo tumoral y que las células del lunar deben sufrir alteraciones adicionales para liberarse de las restricciones impuestas a su crecimiento y tornarse malignas.

■ COMIENZO DE LA ATIPIA CELULAR

El modelo de Clark sugiere que el paso siguiente para el progreso del melanoma es el desarrollo de atipia celular en los nevos displásicos, los cuales pueden surgir de nevos benignos preexistentes o de lesiones nuevas. Estas lesiones intra-epidermales corresponden a la fase de crecimiento radial (Radial Growth Phase, RGP) y se la considera como el primer estadio maligno de melanoma (Fig. 4) [19].

Las anomalías moleculares en esta etapa de progresión se relacionan con fallas en numerosos genes, algunos de ellos importantes supresores de tumores, y afectan al crecimiento celular, reparación del ADN, y susceptibilidad a la muerte celular [19]. Como se describió anteriormente, la senescencia inducida por estrés oncogénico limita el crecimiento de los lunares. La mutación V600E es un poderoso inductor de este mecanismo a través del incremento de la expresión de la proteína p16^{INK4A}, un inhibidor del ciclo celular [20]. Evidentemente, mutaciones en este gen impedirán la senescencia inducida por BRAF, por lo cual no resulta sorprendente que en el 25-50% de los casos de melanoma, el gen *CDKN2A* se encuentre inactivado por distintos defectos genéticos [21-23]. Este gen codifica dos proteínas supresoras de tumores diferentes, p16^{INK4A} y p19^{ARF} a partir de diferentes marcos de lectura [24] (Fig. 6). La susceptibilidad a melanoma que se asocia con la pérdida de *CDKN2A* sugiere que las fallas en este gen incrementan la probabi-

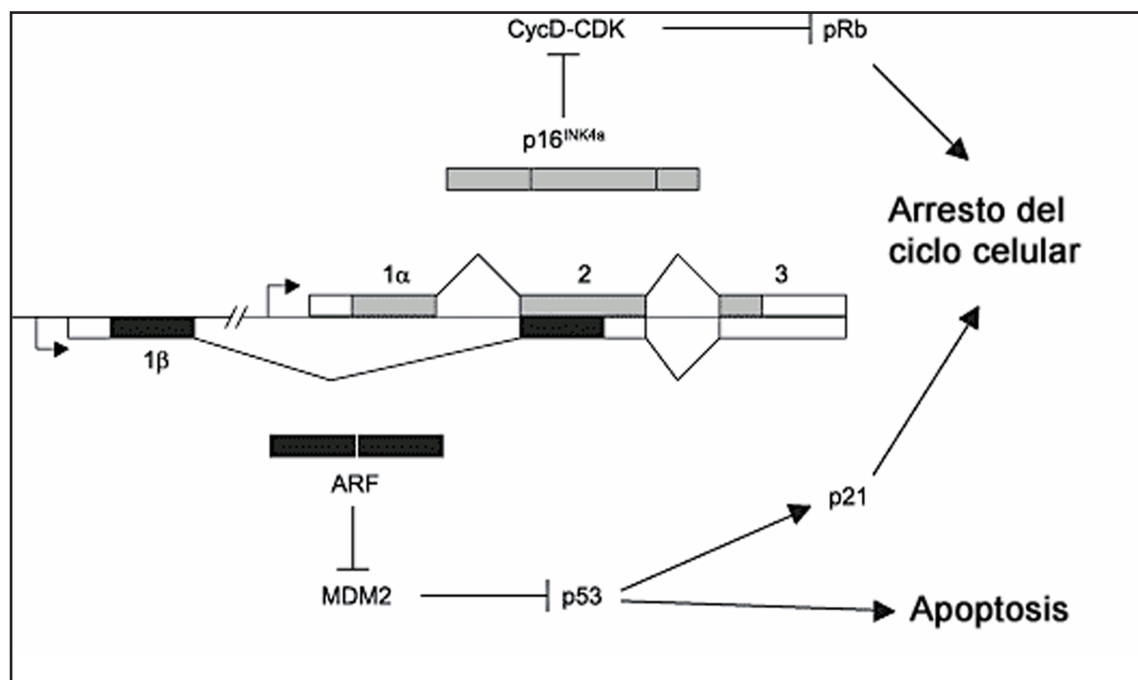


Figura 6. El locus CDKN2A.

Esta región cromosomal contiene dos genes que codifican (en distintas hebras del ADN) las proteínas p16^{INK4A} (en gris) y p19^{ARF} (en negro). p16^{INK4A} está involucrada en el arresto del ciclo celular (Cell cycle arrest) y p19^{ARF} está involucrada en arresto del ciclo celular y apoptosis. Ambos genes se encuentran mutados frecuentemente en melanoma y por lo tanto no pueden cumplir con sus funciones.

lidad de que un nevo displásico se convierta en maligno o la probabilidad de aparición de un nuevo melanoma. p16^{INK4A} actúa uniéndose a las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6. Estas quinasas se activan cuando se unen a ciclinas de tipo D y fosforilan a la proteína de Retinoblastoma (Rb), la cual se disocia del factor de transcripción E2F. Liberado de su inhibidor, E2F inicia la transcripción de genes relacionados con la progresión G1-S del ciclo celular con lo que la célula comienza a dividirse. INK4A suprime la proliferación de células que han sufrido daños en su ADN o la activación de algún oncogén, y también de células envejecidas o de cultivos sobrecrecidos [25]. En caso de pérdida de función de Rb, la muerte celular puede ser mediada por p19^{ARF} a través de su asociación con la proteína MDM2 (*Mouse double minute 2*). Cuando está libre, MDM2 se une al factor de transcripción p53, inhibiendo su activación y promoviendo su degradación. Al ser MDM2 secuestrada por p19^{ARF},

se produce la acumulación de p53 con lo que bloquea el ciclo celular en la transición G2-M y permite la reparación del ADN dañado, o induce apoptosis [26, 27].

El locus *CDKN2A* presenta pérdidas por delección en un 50 % de los melanomas, familiares o esporádicos, y se encuentra ausente por delección homocigota de una porción del cromosoma 9 en un 10 % de los casos, lo que lo hace la región con pérdida más frecuente en melanoma [28-30]. En otros casos, sólo p16^{INK4A} está inactivado por mutaciones puntuales, delecciones, metilación del promotor o silenciamiento por sobreexpresión de su inhibidor transcripcional ID1 (Inhibitor of Differentiation 1). Las mutaciones en p19^{ARF} explican al menos en parte por qué la frecuencia de mutaciones en p53 es tan baja en melanoma, ya que, al inactivar la misma vía, mutaciones simultáneas en ambas resultan redundantes [25]. Los genes de CDK4 y ciclina D1, proteínas ambas que actúan a posteriori de INK4A en la señalización, también presentan

frecuentes mutaciones y amplificaciones en melanoma. Algunos niños con melanoma portan mutaciones congénitas en CDK4 que impiden su interacción con INK4A, lo que la libera de la inhibición [31]. Las delecciones en *CDKN2A* y amplificaciones de *CDK4* tendrían efecto redundante y se ha observado que son mutuamente excluyentes.

Una segunda región cromosomal que suele estar afectada frecuentemente por delección homocigota en melanoma y en otros tipos de cáncer es el locus *PTEN*, ubicado en el cromosoma 10 [32, 33]. Entre 30-50% de las líneas celulares de melanoma y entre 5-20% de los tumores presentan inactivación de *PTEN* por mutación o delección, aunque se desconoce con exactitud en qué momento de la progresión ocurrirían estas fallas, ya que son más frecuentes en melanomas avanzados [23]. *PTEN* codifica una fosfatasa que regula negativamente la señalización de la vía PI3K/Akt. PI3K es una quinasa que fosforila PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato) convirtiéndolo en PIP3 (fosfati-

dilinositol trifosfato). Esta vía es activada, en células normales, por una variedad de factores de crecimiento que al unirse a su receptor, provocan un incremento rápido de los niveles intracelulares de PIP3. El aumento de PIP3 en la célula induce la activación de la quinasa PDK1 (proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol) la cual fosforila y activa varias proteínas quinasas, entre las cuales se encuentra la quinasa AKT, también conocida como PKB. Esta última a su vez fosforila una plétera de proteínas, muchas de las cuales suprimen el ciclo celular o estimulan la apoptosis. Al ser fosforiladas por AKT, se inactivan de modo que se facilita la proliferación y supervivencia celular. En condiciones normales, PTEN mantiene bajos los niveles de PIP3 y por lo tanto los niveles de Akt activa. Sin embargo, en su ausencia, ambas se incrementan. Entre los múltiples efectos, directos o indirectos, de la activación de Akt en melanoma se encuentran: la inhibición de p53 (por medio de la activación de MDM2) y otros inhibidores del ciclo celular (p21, p27), la inhibición de factores pro-apoptóticos (BAD, procaspasa-9), la activación de factores anti-apoptóticos (Bcl2, Mcl-1), la activación de la quinasa mTOR, que estimula el crecimiento celular, y la activación de los factores de transcripción β -catenina y de NF κ B, que aumentan la expresión de numerosos genes involucrados en supervivencia y proliferación celular [23]. La activación de esta vía también se relaciona con los cambios en la expresión de caderinas que facilitan la invasión del tumor [34].

La activación de la vía PI3K/Akt en melanoma también se origina por mutaciones en PI3K (halladas en un 3% de melanomas metastáticos) o por la sobreexpresión de Akt3 hasta en un 60% de los melanomas) en general por amplificación del gen que la codifica [35]. En comparación con melanocitos normales, los niveles elevados de activación de Akt se han detectado en la fase de crecimiento radial y aumentan a lo largo de las sucesivas etapas [36]. La

presencia de mutaciones o deleciones de *PTEN* en melanoma coinciden con la presencia de mutaciones en *BRAF*, pero no en *NRAS*. Dado que mutaciones en *NRAS* activan tanto la vía MAPK como la de PI3K (a diferencia de *BRAF* que sólo activa la primera) se considera que independientemente del mecanismo, la activación de ambas vías es necesaria para el desarrollo de melanoma [28]. Esto está avalado por el hecho de que tanto la señalización de las MAPK como de PI3K deben ser inhibidas a los efectos de suprimir el crecimiento celular en cultivos tridimensionales de melanoma [35].

■ CAMBIOS EN ADHESIÓN CELULAR, INVASIÓN Y METÁSTASIS

La invasión local y la metástasis son las responsables de la mortalidad en melanoma. En el modelo de progresión de Clark, las características invasivas aparecen durante la fase de crecimiento vertical (vertical growth phase, VGP), cuando las células de melanoma atraviesan la membrana basal y adquieren la capacidad de crecer en la dermis formando un nódulo expansivo (Fig. 4). La metástasis de melanoma se desarrolla cuando estas mismas células se disocian de la lesión primaria, migran al estroma circundante e invaden vasos arteriales y linfáticos para formar un tumor en algún sitio distante [37]. Tanto la invasión como la diseminación de melanoma están relacionadas con alteraciones en la adhesión celular. En condiciones normales, las moléculas de adhesión celular controlan la migración celular, la organización tisular y la organogénesis [38]. Alteraciones en la expresión de estas moléculas provocan señalización celular aberrante, interacciones anómalas del tumor con el estroma y facilitan la invasión del tejido circundante. Entre las moléculas que modulan este proceso se encuentran las proteínas de la familia de las caderinas y las integrinas.

Las caderinas son proteínas de

transmembrana responsables de la adhesión intercelular, que participan también en la señalización intracelular. Poseen un dominio extracelular por el que se conectan con caderinas similares de células adyacentes, formando regiones de contacto celular denominadas uniones adherentes. Su dominio intracelular, forma parte de un gran complejo proteico que se conecta con los filamentos de actina del citoesqueleto a través de las proteínas de anclaje α - y β -catenina. Varias vías de señalización provocan la disociación de β -catenina del complejo de adhesión y su translocación al núcleo donde regulan la transcripción de sus genes blanco. Las caderinas clásicas se dividen en cuatro subtipos, denominados según el tejido en donde fueron halladas: E (epiteliales), presentes en células epiteliales polarizadas de la epidermis, incluyendo melanocitos y queratinocitos; VE (vasculares-endoteliales); P (placentarias); y N (neurales), siendo estas últimas propias de células mesenquimáticas presentes en la dermis, tales como los fibroblastos.

Las caderinas sólo forman uniones homofílicas, esto es, con otras moléculas del mismo tipo. Tanto los melanocitos como los queratinocitos de la epidermis expresan E-caderina e interactúan gracias a ésta. El contacto de los melanocitos con los queratinocitos indiferenciados de la membrana basal inhibe la proliferación de los melanocitos y mantiene el equilibrio entre ambos tipos celulares [39, 40]. La progresión de melanoma desde la fase de crecimiento radial a la vertical, está caracterizada por la pérdida de E-caderina y el aumento de expresión de N-caderina (89,91). N-caderina es característica de los carcinomas invasivos y posibilita la diseminación metastática permitiendo a las células de melanoma interactuar con otras células que expresen N-caderina como los fibroblastos de la dermis y el endotelio vascular [39, 41].

En los órganos, las células no sólo interactúan entre sí, sino también lo hacen con la matriz ex-

tracelular (MEC) que las rodea. Otro tipo de proteínas de transmembrana, las integrinas, actúan como receptores para fibronectina, colágeno y laminina, componentes esenciales de la MEC [42], y la conectan con el citoesqueleto de la célula. También activan vías de señalización intracelular que informan a la célula las características de la matriz en la que está inmersa. Las integrinas son en realidad heterodímeros formados por dos subunidades denominadas α y β . Los tipos de cadenas polipeptídicas α y β que forman los distintos tipos de integrinas determinan su especificidad y función. Además del cambio en la expresión de caderinas, la transición de crecimiento radial a vertical también se asocia con un cambio en el patrón de expresión de integrinas en las células de melanoma, volviéndose más abundante la integrina $\alpha_v\beta_3$ [43]. Esta integrina posee un mayor espectro de interacción y por ende puede unirse a nuevos componentes de la MEC como fibronectina, con la que no interactúan los melanocitos normales. Esto induce la activación de FAK (*Focal adhesion kinase*), la cual contribuye a aumentar la expresión de genes como la metaloproteinasas de matriz 2 (MMP-2) y otras enzimas que degradan los componentes de la MEC y de la membrana basal [44]. Además, la integrina $\alpha_v\beta_3$ aumenta la expresión de BCL-2 [45] y estimula la motilidad de las células de melanoma a través de la reorganización de su citoesqueleto [46]. Todos estos eventos permiten que la célula migre a través de la MEC, prolifere e invada otros tejidos.

■ DISTINTOS PATRONES DE ALTERACIÓN GENÉTICA EN MELANOMA

Como ya hemos visto, la clasificación de melanoma se basa en cuatro tipos de crecimiento histológico básicos: SSM, LMM, NM y ALM. El uso de esta clasificación es controversial debido a su poca aplicabilidad clínica. En los últimos años se ha sugerido una nueva cla-

sificación basada en que las diferencias observadas entre melanomas originados en distintas regiones del cuerpo se relacionan directamente con su exposición diferencial a la luz UV. Varios estudios moleculares han demostrado que esta exposición diferencial se correlaciona con distintos patrones de alteraciones genéticas y dieron sustento a una nueva clasificación de melanoma en: melanomas de piel crónicamente expuesta a luz UV (de cabeza y cuello), melanomas de piel intermitentemente expuesta a luz UV (de tronco y extremidades), melanomas acrales (de las palmas de las manos, plantas de los pies) y melanomas de las membranas mucosas (en epitelios internos que nunca son expuestos al sol). Los melanomas primarios agrupados de esta manera presentan diferencias tanto en tipo y número de aberraciones cromosómicas, como en mutaciones en genes específicos, sugiriendo que estos grupos de tumores se desarrollan por mecanismos diferentes en respuesta a presiones selectivas diferentes. Las diferencias son más pronunciadas entre melanomas de piel relativa o absolutamente protegida del sol (melanomas acrales y de las mucosas), y melanomas de la piel con diferentes grados de exposición al sol. Específicamente, los primeros muestran un grado significativamente más alto de aberraciones cromosómicas. Se encontraron amplificaciones en un 89% de los melanomas acrales y un 85% en melanomas de las mucosas, aunque las regiones genómicas implicadas fueron diferentes entre ambos grupos. Por el contrario, en los grupos de melanomas de piel con exposición crónica o intermitente al sol las amplificaciones fueron menos frecuentes [28].

Por su parte, se determinó que las mutaciones en BRAF son más comunes en el grupo de melanoma con exposición intermitente al sol que en los otros tres grupos. Por el contrario, no se encontraron asociaciones entre las mutaciones en el oncogén NRAS y los distintos subgrupos ya que NRAS presenta mutaciones en 10-15% de los melanomas de todos

los grupos. Como hemos mencionado anteriormente, las mutaciones en BRAF o en NRAS son mutuamente excluyentes. Se observó que en los tumores que no portaban ninguna de estas dos mutaciones, con frecuencia se encuentra amplificación del gen CCND1 (ciclina D1); lo que sugiere que, ya sea por mutación de los genes río arriba de la vía o por un incremento en el número de copias del propio CCND1, su expresión es un evento clave en la progresión de melanoma. La proteína CDK4, que se asocia a la función de ciclina D1, también es un foco de amplificación recurrente, y estas amplificaciones son más frecuentes en melanomas acrales y de las mucosas que en los otros dos grupos. Los casos en los que se encontró amplificación de CDK4 no mostraron mutación en BRAF, NRAS o amplificación de CCND1, sugiriendo una vez más la redundancia de estas anomalías en la estimulación de la proliferación celular. El locus CDKN2A, que codifica a p16^{INK4A}, el principal inhibidor del complejo CDK4-CiclinaD1 es la región genómica que presenta pérdidas con mayor frecuencia en melanoma, encontrándose deletada en un 50% de los casos. Los tumores que presentan delección homocigota de CDKN2A, no presentan amplificaciones de CDK4, dado que también serían eventos redundantes [28]. Recientemente se determinó que el 46% de los melanomas oculares de la uvea presentan mutaciones en el codón 209 de la proteína GNAQ que codifica para la sub-unidad α de la proteína G. Esta mutación no es observada en ninguno de los otros tipos de melanoma y resulta en la activación constitutiva de esta proteína la cual pasa a actuar como oncogén [47].

En lo que respecta a la activación de la vía de PI3K, PTEN, regulador negativo de esta vía, es uno de los genes más frecuentemente mutado en melanoma, en la mayoría de los casos por delección. Ya sea por delección o mutación puntual, la falta de actividad de PTEN resulta en la activación de la vía. Dado que las alteraciones de este gen se presen-

tan generalmente en forma simultánea con las mutaciones en BRAF, se deduce que PTEN se encontraría afectado en la mayoría de los melanomas de piel con exposición crónica o intermitente al sol [28].

Por otra parte, se encontró que KIT, un receptor tirosina quinasa capaz de activar tanto la vía MAPK como PI3K/Akt, se encuentra activado por amplificación y/o mutación en muchos de los tumores que no presentan mutaciones en BRAF. Se detectaron alteraciones en KIT en un 39% de los tumores de las mucosas, un 36 % de los acrales y un 28% de los melanomas de piel crónicamente expuesta al sol; mientras que no se encontró en ninguno de los melanomas de piel con exposición intermitente, en relación inversa con las mutaciones de BRAF [48]. KIT es el receptor para SCF (Stem Cell Factor), un mitógeno crucial para el desarrollo de melanocitos y melanoblastos. Paradójicamente la expresión de KIT está disminuida en la mayoría de los melanomas en comparación con melanocitos normales, pero parece estar activado en estos subgrupos de melanomas sin mutaciones en BRAF o NRAS.

En síntesis, los melanomas acrales y de las mucosas (que tienen poca o nula exposición al sol) son mecanísticamente más similares entre sí que con los otros dos. Sin embargo, existen diferencias morfológicas y genéticas suficientes entre ambos como para conservar su identidad independiente. Por otra parte, también existen diferencias entre los grupos de tumores en los que la luz UV tiene un papel preponderante. Los melanomas de piel con exposición intermitente presentan una mayor frecuencia de mutaciones en BRAF y pérdidas en el cromosoma 10 donde se ubica PTEN, mientras que melanomas de piel crónicamente expuesta presentan mutaciones en BRAF con mucha menor frecuencia y, por el contrario, tienen mayor tasa de amplificación del gen CCND1. Los melanomas que surgen en sitios de exposición crónica al sol se desarrollan típicamente en etapas más tardías de la vida y están asociados

con otras neoplasias relacionadas a la luz UV como queratosis solar, sugiriendo que se requieren dosis acumuladas de luz UV para su desarrollo. En contraste, los melanomas que se originan en la piel con exposición intermitente al sol suelen desarrollarse a edades más tempranas y en personas que tienen una mayor cantidad de lunares y un menor número de queratosis solares. Por esto se supone que las personas que desarrollan melanomas en la piel intermitentemente expuesta al sol tienen una susceptibilidad mayor a la luz UV, lo que implica un incremento en la probabilidad de adquirir mutaciones en BRAF o de proliferar si tales mutaciones ocurren. Por el contrario, los pacientes con melanocitos menos susceptibles requerirían una dosis acumulativa alta de luz UV para desarrollar melanoma y por eso los presentarían en zonas crónicamente expuestas al sol, tales como la cara [28].

La evidencia acumulada no sólo confirma el rol crucial de las vías de señalización implicadas (MAPK y PI3K), sino también la necesidad de una clasificación más adecuada a las diferencias biológicas y genéticas entre subgrupos de melanoma.

Aunque muchas de las alteraciones halladas tienen consecuencias similares, las diferencias en el patrón de aberraciones de los subgrupos propuestos sugieren que éstas podrían tener funciones adicionales que son importantes en el desarrollo y evolución del tumor, y que tendrían por lo tanto, respuestas distintas a determinadas terapias. Esto enfatiza la necesidad de la caracterización molecular de cada tumor y el desarrollo de terapias específicamente diseñadas para cada paciente.

■ EL TRATAMIENTO DE MELANOMA

Las opciones terapéuticas a seguir en el paciente con melanoma dependen fuertemente del estadio alcanzado por el tumor. El tratamiento del estadio 0 implica ge-

neralmente la realización de una cirugía con el objeto de extirpar el área de células anormales y una cantidad pequeña de tejido normal a su alrededor (usualmente 0,05 cm para este estadio). Para el estadio I, usualmente se recomienda acompañar la cirugía descrita con la realización de una biopsia del ganglio linfático centinela. El motivo de este procedimiento es determinar la diseminación de células cancerosas al ganglio con mayores probabilidades de diseminación. Ulteriores tratamientos dependerán del resultado de este ensayo. La cirugía y la biopsia del ganglio centinela también se realizan en pacientes en estadio II. Estos pacientes presentan mayores riesgos de diseminación y de compromiso de otros ganglios linfáticos. Por este motivo, la cirugía suele ser seguida por tratamientos adyuvantes como interferón- α (INF- α) o interleuquina 2 (IL-2). Estas y otros tratamientos adyuvantes, actualmente en etapa de experimentación, tienen como objetivo fortalecer y ayudar al sistema inmune a combatir las células tumorales. Las opciones hasta aquí descritas también se aplican en pacientes en los estadios III y IV pero en estos casos es imprescindible realizar tratamientos adicionales dirigidos contra los focos de metástasis (ver siguiente sección). Dependiendo de cada caso particular, puede ser necesario tomar medidas paliativas con el fin de mejorar la calidad de vida del paciente.

■ ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL MELANOMA METASTÁTICO

Las vías de señalización alteradas descritas en este artículo representan solo una pequeña muestra de la extraordinaria complejidad molecular de las células de melanoma. Además, el melanoma es una enfermedad muy agresiva, con gran potencial metastático y una resistencia notable a los agentes citotóxicos utilizados en las terapias quimioterapéuticas convencionales empleadas en otros tipos de cáncer. Estas características se deberían a que

los melanocitos se originan a partir de células con alta motilidad y que tienen exacerbadas las propiedades relacionadas con la supervivencia celular. Todas estas razones seguramente contribuyen a la dificultad en desarrollar terapias que prolonguen la supervivencia de los pacientes con melanoma avanzado. Dada la carencia de terapias efectivas, muy frecuentemente se sugiere a pacientes con melanoma avanzado incorporarse a distintos tipos de ensayos clínicos. Un ensayo clínico consiste en un estudio de investigación que procura analizar el efecto de nuevos agentes terapéuticos en pacientes. Generalmente, estas nuevas terapias han demostrado previamente tener algún efecto benéfico en experimentos realizados en animales experimentales con melanoma.

En los últimos 30 años se han ensayado sin éxito distintos tipos de tratamientos incluyendo quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, vacunas y terapias dirigidas. A la fecha, Dacarbazina (DTIC) es el agente terapéutico de referencia y aprobado oficialmente para el tratamiento de melanoma avanzado ya que en ensayos clínicos se observaron respuestas parciales en aproximadamente 10% de los pacientes. Otras drogas como Carmustina (BiCNU), Paclitaxel (Taxol), Temozolomida y Cisplatino también han mostrado cierto efecto como agentes quimioterapéuticos simples en fase metastática [49]. Sin embargo, estos niveles de respuesta muchas veces no han podido ser reproducidos. La gran desventaja de estos tratamientos es que resulta imposible predecir qué pacientes responderán a estas drogas ya que no se ha hallado ningún indicador clínico o molecular.

Otra característica saliente del melanoma es su inmunogenicidad y la persistencia en el paciente de linfocitos T dirigidos contra antígenos de melanoma. Esta característica ha intentado ser explotada con el objeto de desarrollar inmunoterapias contra esta enfermedad [50]. En un principio se intentó fortalecer la respuesta inmune mediante la administración de IL-2 o INF- α , pero

la tasa de respuesta fue baja y con una elevada toxicidad [49]. Actualmente el uso de IFN- α suele estar restringido a terapias adyuvantes postquirúrgicas ya que puede retrasar la recurrencia de melanoma. Otra estrategia muy utilizada se basa en la identificación y multiplicación *in vitro* mediante distintas técnicas, de poblaciones de células T del paciente reactivas contra antígenos de melanoma. Estos linfocitos son luego reinyectados al paciente con la intención de que desarrollen una respuesta citotóxica contra el tumor. A lo largo de los años estas estrategias han obtenido tasas de respuestas bajas, aunque aquéllos pocos pacientes que respondieron contra el tumor presentaron respuestas duraderas [38, 51]. En los últimos años, la aplicación de nuevas tecnologías como la manipulación genética de los receptores de las células T en las células extraídas de los pacientes ha dado resultados interesantes, por lo cual se estima que esta terapia posee cierto potencial.

■ TERAPIAS DIRIGIDAS

Las terapias dirigidas consisten en fármacos u otras sustancias que se unen (y activan o inhiben) a moléculas específicas dentro de la célula que promueven el crecimiento y el avance de los tumores. Dado que estas terapias se enfocan en cambios moleculares y celulares específicos de la célula tumoral, es posible que las terapias dirigidas sean más efectivas que otros tratamientos, como la quimioterapia y radioterapia, y menos dañinas para las células normales. Por lo tanto, el desarrollo de las terapias dirigidas requiere la identificación de blancos moleculares que estén alterados en cáncer y cuya inhibición afecte vías de transducción de señales implicadas en el desarrollo tumoral. El concepto de "adicción oncogénica" supone que las células cancerosas muestran mayor dependencia de las vías de proliferación hiperactivadas que las células normales, y por lo tanto de los oncogenes implicados en esas vías. Esto

ofrece la posibilidad de desarrollar terapias dirigidas ya que las células cancerígenas serán más sensibles a la inhibición de esas vías que las células normales. Este concepto puede extenderse y permite comparar células tumorales que presentan activación de una vs. varias vías de señalización. Es notable que las células de melanoma con mutación en BRAF son más sensibles a la inhibición de la vía MAPK que las células con mutación en RAS [52]. Aunque estas dos proteínas señalizan a través de ERK, RAS activa vías alternativas como la de PI3K/Akt y hace a las células menos dependientes de la vía MEK. Por la misma razón, es de esperar que los tumores que presenten mutación de RAS respondan menos a la inhibición de esta vía que los tumores con mutación en BRAF.

No todos los oncogenes son blancos factibles para implementar terapias dirigidas, pero las enzimas como quinasas, proteasas y fosfatasas tienen "bolsillos" en sus sitios catalíticos donde pueden entrar moléculas pequeñas, específicamente diseñadas y así inhibir su actividad enzimática. Los blancos más atractivos son aquellas enzimas que en general se encuentran activas en el tumor y que dirigen las principales vías involucradas en la progresión tumoral. Dado el rol crítico de la vía de las MAPK en melanoma, muchas terapias dirigidas se focalizaron en inhibir distintos componentes de esta vía, como se verá a continuación.

El primer inhibidor de BRAF empleado en pacientes con melanoma fue Sorafenib (BAY 43-9006), ya que este estaba siendo utilizado en carcinoma renal y hepatocelular. Sorafenib fue desarrollado como un inhibidor de RAF pero luego se demostró que también inhibe receptores de tirosina quinasa como VEGFR (Vascular Endotelial Growth Factor) c-Kit y PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) [53]. Sorafenib no mostró actividad anti-melanoma al ser utilizado como monoterapia y su combinación con carboplatino o paclitaxel no produjo cambio en la supervivencia de los pacientes [54]. Es-

tos resultados orientaron el desarrollo de inhibidores específicos contra las formas mutadas de BRAF. Uno de estos compuestos de segunda generación, PLX4032 inhibe la forma mutada de BRAF (V600E) pero no la forma normal de BRAF. Además demostró una alta especificidad al ser probado en un panel de 70 proteínas quinasa. En un reciente ensayo clínico de fase I, esta droga mostró una gran actividad antitumoral en la mayoría de los pacientes con BRAF V600E y regresión de los tumores luego de dos semanas posteriores al comienzo del tratamiento. A pesar de que estos resultados representan un avance importantísimo en la lucha contra esta enfermedad, este tratamiento presenta ciertas limitaciones. Una de ellas es que este inhibidor no es efectivo en pacientes con mutaciones en NRAS. Un problema que también debe ser solucionado es la aparición de carcinoma de células escamosas (otro tipo de cáncer de piel no-melanoma) en algunos pacientes bajo tratamiento. Este efecto no deseado se debe a que PLX4032 causa una activación paradójica de ERK por activación de CRAF en células que poseen BRAF no mutado [55-57].

Este inconveniente podría teóricamente ser evitado con drogas que se encuentran actualmente en ensayos clínicos como RAF265 que inhiben las tres isoformas de RAF así como también V600E. Otros compuestos que inhiben la vía de las MAPK que están siendo evaluadas en ensayos clínicos son los inhibidores de MEK como PD0325901 y AZD6244, pero hasta el momento estos han presentado cierta toxicidad [58].

La experiencia obtenida con otros inhibidores de proteínas quinasa en el pasado y algunos resultados preliminares obtenidos con PLX4032 indica que luego del efecto de regresión tumoral, puede presentarse el relapso de los tumores debido a la aparición de resistencia a la droga. Desde el punto de vista molecular, esto implica la aparición de nuevas mutaciones que afectan la proteína blanco u otras proteí-

nas y que neutralizan el efecto de la droga. Por este motivo, es necesario continuar con el desarrollo de nuevos agentes para utilizar ante la aparición de resistencias.

Como se mencionó anteriormente, las diferencias a nivel genético observadas en los distintos tipos de melanoma son de mucha utilidad para dar con tratamientos eficaces. Un subgrupo de pacientes con melanoma uveal (que no poseen mutaciones en BRAF) presentan mutaciones en el receptor c-Kit que disparan la actividad tirosina quinasa del receptor. Estos pacientes están siendo tratados exitosamente con imatinib y dasatinib, compuestos diseñados contra la quinasa quimérica BCR/ABL que también inhiben KIT y PDGFR. La utilización de estas drogas fue desarrollada con muy buen resultado en leucemia mieloide crónica [59] y tumores gastrointestinales (GIST) que presentan mutaciones similares en c-Kit [60].

Otra de las vías de señalización activas en melanoma es la vía de PI3K/Akt. Esta se encuentra activa en forma constitutiva en melanoma como resultado de la inactivación del supresor de tumores PTEN o de mutaciones en NRAS. Estos pacientes no son beneficiados por PLX4032 y requieren el empleo de inhibidores específicos contra esta vía. Actualmente se encuentra en fase de prueba inhibidores para PI3K, Akt, y uno de sus sustratos, mTOR (Mammalian Target of Rapamycin). En general estas drogas muestran efectos leves como agentes simples por lo que se estudia su combinación con otros agentes, por ejemplo inhibidores de la vía RAS-ERK o compuestos que disminuyan la resistencia a apoptosis de melanoma. Entre estas últimas, se encuentran compuestos contra el factor de transcripción NF- κ B y el inhibidor de apoptosis Bcl-2. Ensayos clínicos con oligonucleótidos antisentido diseñados contra Bcl-2 han mostrado eficacia sensibilizando a las células de melanoma a la quimioterapia, con mejoras en la sobrevida libre de progresión cuando se administraron en combinación con Dacarbazina [61, 62].

Otra estrategia que se ha explorado son los compuestos que inhiben la angiogénesis, un importante paso en el desarrollo del tumor. Factores angiogénicos como VEGF, IL-8, bFGF y PDGF se encuentran presentes en el microambiente tumoral. Tanto inhibidores del receptor de VEGF (SU5416 y AG013736) como anticuerpos que neutralizan el receptor demostraron actividad anti-tumoral en ratones pero no han dado aún resultados satisfactorios en ensayos clínicos [63].

■ CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La identificación de las vías de señalización involucradas en el inicio, progresión y metástasis de melanoma está abriendo un campo que ofrece nuevas y numerosas posibilidades para el tratamiento. Sin embargo para que estas nuevas terapias dirigidas den los resultados esperados será necesario implementar de aquí en adelante la realización de estudios genéticos en los pacientes con melanoma para determinar el tratamiento más adecuado en función de las alteraciones genéticas presentes en cada uno de ellos. Esta información a su vez será de utilidad para utilizar en forma racional combinaciones de distintos agentes terapéuticos.

■ BIBLIOGRAFIA

1. A.L. Kierszenbaum, *Histology and Cell Biology*, 2nd Edition, 2006.
2. Evelyne Sage, Régen Drouin, Mahmoud Rouabhia, *From DNA photolesions to mutations, skin cancer and cell death*. Royal Society of Chemistry, 2005.
3. Slominski, A., et al., *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1155-228.
4. Fecher, L.A., et al., *Toward a molecular classification of melanoma*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(12): p. 1606-20.
5. Boissy, R.E. and J.J. Nordlund, *Molecular basis of congenital*

- hypopigmentary disorders in humans: a review.* Pigment Cell Res, 1997. **10**(1-2): p. 12-24.
6. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma.* N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 51-65.
 7. Duncan, L.M., *The classification of cutaneous melanoma.* Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 501-13, ix.
 8. Pleasance, E.D., et al., *A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome.* Nature. **463**(7278): p. 191-6.
 9. Balch, C.M., et al., *An evidence-based staging system for cutaneous melanoma.* CA Cancer J Clin, 2004. **54**(3): p. 131-49; quiz 182-4.
 10. Clark, W.H., Jr., et al., *A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.* Hum Pathol, 1984. **15**(12): p. 1147-65.
 11. Bennett, D.C., *How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events?* Pigment Cell Melanoma Res, 2008. **21**(1): p. 27-38.
 12. Braig, M. and C.A. Schmitt, *Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development.* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2881-4.
 13. Coso et al. *Ciencia e Investigación* 54, # 2, 2003.
 14. Viros, A., et al., *Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features.* PLoS Med, 2008. **5**(6): p. e120.
 15. Albino, A.P., et al., *Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype.* Oncogene, 1989. **4**(11): p. 1363-74.
 16. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
 17. Omholt, K., et al., *NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6483-8.
 18. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi.* Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 19-20.
 19. Zaidi, M.R., C.P. Day, and G. Merlino, *From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse.* J Invest Dermatol, 2008. **128**(10): p. 2381-91.
 20. Michaloglou, C., et al., *BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi.* Nature, 2005. **436**(7051): p. 720-4.
 21. Nobori, T., et al., *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers.* Nature, 1994. **368**(6473): p. 753-6.
 22. Flores, J.F., et al., *Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma.* Cancer Res, 1996. **56**(21): p. 5023-32.
 23. Wu, H., V. Goel, and F.G. Haluska, *PTEN signaling pathways in melanoma.* Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3113-22.
 24. Kamb, A., et al., *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.* Science, 1994. **264**(5157): p. 436-40.
 25. Sharpless, E. and L. Chin, *The INK4a/ARF locus and melanoma.* Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3092-8.
 26. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops.* Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
 27. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53.* Cell, 1998. **92**(6): p. 713-23.
 28. Curtin, J.A., et al., *Distinct sets of genetic alterations in melanoma.* N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2135-47.
 29. Hussussian, C.J., et al., *Germline p16 mutations in familial melanoma.* Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 15-21.
 30. Pollock, P.M. and J.M. Trent, *The genetics of cutaneous melanoma.* Clin Lab Med, 2000. **20**(4): p. 667-90.
 31. Zuo, L., et al., *Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma.* Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 97-9.
 32. Guldberg, P., et al., *Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma.* Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3660-3.
 33. Steck, P.A., et al., *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers.* Nat Genet, 1997. **15**(4): p. 356-62.
 34. Meier, F., et al., *The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma.* Front Biosci, 2005. **10**: p. 2986-3001.
 35. Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, and R. Marais, *Melanoma biology and new targeted therapy.* Nature, 2007. **445**(7130): p. 851-7.
 36. Stahl, J.M., et al., *Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma.* Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7002-10.
 37. Haass, N.K., et al., *Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma.* Pigment Cell Res, 2005. **18**(3): p. 150-9.
 38. Johnson, J.P., *Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma.* Cancer Metastasis Rev, 1999. **18**(3): p. 345-57.
 39. Hsu, M., et al., *Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression.* J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 9): p. 1535-42.
 40. Valyi-Nagy, I.T., et al., *Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact.* Lab Invest, 1993. **69**(2): p. 152-9.
 41. Danen, E.H., et al., *E-cadherin expression in human melanoma.* Melanoma Res, 1996. **6**(2): p. 127-31.
 42. Kuphal, S., R. Bauer, and A.K. Bosserhoff, *Integrin signaling in malignant melanoma.* Cancer Metastasis Rev, 2005. **24**(2): p. 195-222.

43. Danen, E.H., et al., *Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression*. *Histopathology*, 1994. **24**(3): p. 249-56.
44. Fensterle, J., *[A trip through the signaling pathways of melanoma]*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2006. **4**(3): p. 205-17.
45. Petittlerc, E., et al., *Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival*. *Cancer Res*, 1999. **59**(11): p. 2724-30.
46. Li, X., et al., *Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 14): p. 2665-72.
47. Van Raamsdonk, C.D., et al., *Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi*. *Nature*, 2009. **457**(7229): p. 599-602.
48. Curtin, J.A., et al., *Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(26): p. 4340-6.
49. Tarhini, A.A. and S.S. Agarwala, *Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease*. *Dermatol Ther*, 2006. **19**(1): p. 19-25.
50. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. *Science*, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
51. Chapman, P.B., *Programming T cells for adoptive T cell transfer therapy*. *Pigment Cell Melanoma Res*. **23**(2): p. 155-6.
52. Solit, D.B., et al., *BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition*. *Nature*, 2006. **439**(7074): p. 358-62.
53. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
54. Hauschild, A., et al., *Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(17): p. 2823-30.
55. Poulidakos, P.I., et al., *RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF*. *Nature*. **464**(7287): p. 427-30.
56. Heidorn, S.J., et al., *Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF*. *Cell*. **140**(2): p. 209-21.
57. Garber, K., *Cancer research. Melanoma drug vindicates targeted approach*. *Science*, 2009. **326**(5960): p. 1619.
58. Collisson, E.A., et al., *Treatment of metastatic melanoma with an orally available inhibitor of the Ras-Raf-MAPK cascade*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5669-73.
59. O'Dwyer, M.E., M.J. Mauro, and B.J. Druker, *STI571 as a targeted therapy for CML*. *Cancer Invest*, 2003. **21**(3): p. 429-38.
60. Heinrich, M.C., et al., *Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(23): p. 4342-9.
61. Bedikian, A.Y., et al., *Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(29): p. 4738-45.
62. Del Bufalo, D., et al., *Treatment of melanoma cells with a bcl-2/bcl-xL antisense oligonucleotide induces antiangiogenic activity*. *Oncogene*, 2003. **22**(52): p. 8441-7.
63. Basu, B., et al., *Angiogenesis in cutaneous malignant melanoma and potential therapeutic strategies*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009. **9**(11): p. 1583-98.

■ GLOSARIO

Queratinocitos: células predominantes de la epidermis.

Melanocitos: célula especializada

de la epidermis que sintetiza la melanina.

Nucleótidos: El ADN esta formado por 4 tipos de nucleótidos Adenina, Guanina (ambos denominados purinas) Citosina y Timidina (ambos denominados pirimidinas).

Displasia: tejido que presenta células con distintos tipos de anormalidades (tamaño, forma, organización, etc). Estos cambios pueden o no ser previos al desarrollo de una neoplasia, el proceso que lleva a la formación de un tumor.

Exón: segmento de un gen que contienen las secuencias que codifican la proteína.

Índice de Breslow: medición milimétrica del grosor del tumor.

Nivel de Clark: describe el nivel cutáneo de invasión. Utilizado para determinar el grado de avance del tumor.

Mutación puntual. Reemplazo de un nucleótido por otro distinto en el ADN.

Deleción: pérdida de un segmento de ADN (de tamaño variable) en un cromosoma.

Translocación. Segmento de ADN que es movilizado desde su ubicación natural en el cromosoma hacia otra ubicación en el mismo o en otro cromosoma.

Amplificación: un segmento de ADN que se encuentra repetido en el cromosoma.

Inserción. Agregado de un nucleótido o de un fragmento de ADN en el cromosoma.

Mitógeno: que induce mitosis.

Diferenciación (celular): proceso fisiológico, en virtud del cual, células madre o pluripotentes sufren cambios que resultan en una célula que se especializa para cumplir una función determinada.

GTPasa: proteínas que realizan la hidrólisis de guanosina trifosfato (GTP).

Quinasa: proteína que ejecuta el proceso de fosforilación.

Fosforilación: adición de un grupo fosfato del ATP a un sustrato específico.

Fosfatasa: proteína que ejecuta el proceso de defosforilación (inverso al de fosforilación).

Proteasa: proteína que degrada a otras proteínas.

Factor de transcripción: proteína que se une al ADN y regula la síntesis de ARN mensajero en un proceso denominado transcripción.

Ciclina : proteínas que regulan el ciclo celular, proceso por el cual una célula se divide en dos células hijas.

Caderinas : proteínas que colaboran a mantener la integridad de los tejidos a través de regular el contacto célula-célula.

Integrinas: similares a las caderinas pero involucradas en el con-

tacto de la célula con la matriz extracelular y ciertos ligandos.

Codón: nombre que recibe una secuencia de tres nucleótidos del ARN mensajero y que codifica para un aminoácido.

Apoptosis: muerte celular programada.

Oncogén: son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer. Se trata de genes normales que han sufrido alguna alteración genética.

Promotor: región de un gen que regula su tasa de transcripción.

Locus: posición de un gen en un cromosoma.

Melanoma Uveal: melanoma del ojo.

Queratosis solar enfermedad benigna de la piel caracterizada por hiperplasia y el engrosamiento del epitelio, en este caso generada por un exceso de exposición solar.

Inmunogenicidad: Sustancia capaz de provocar una respuesta inmune.

Interleuquina-2: proteína que estimula el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos T.

Interferón- α : proteína producida por el sistema inmune y que media la respuesta inflamatoria ante agentes externos.

ACADEMIA NACIONAL DE EDUCACIÓN

Academia Nacional de Educación comunica a usted la aparición del Estudio número 23 de la colección Estudios: "Nuevas universidades para un nuevo país y la educación superior 1968-2010", del Dr. Alberto C. Taquini (h). En él ha recopilado la mayor parte de las publicaciones que realizó en ese período, tendientes a la modificación de la educación superior.

El libro fue presentado en un acto de la Academia realizado el 25 de octubre del corriente a las 17 horas en el Congreso de la Nación.

La publicación incluye a su vez

un DVD de 1.6Gb en el que se han ordenado por tema y por fecha los contenidos antes señalados con el objeto de facilitar a los investigadores la información.

Por ser parte, del nuevo libro la reimpresión de uno anterior, en el que se recopilaron los indicadores que ayudan y determinan la integración de la educación superior y dado que esta se encuentra en pleno desarrollo, los investigadores interesados en estudiar la dinámica del proceso tendrán que actualizar sus datos con aquellos posteriores a las tablas publicadas.

A su vez, el doctor Taquini ha abierto un blog que incluye la obra completa y que puede descargarse gratuitamente, en formato PDF:<http://www.universidadesplantaquini.wordpress.com/>. Éste se enriquecerá con vuestra crítica. Esperando contribuir una vez más al mejoramiento de la educación superior de nuestro país, saludo a usted muy atentamente. Para contactos: univplantaq@gmail.com.

