



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Análisis de la mutación BRAF V600E en una  
serie de pacientes con  
Histiocitosis de Células de Langerhans del  
Hospital de la Misericordia**

**Edna Rocío Quintero Barbón**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Patología  
Bogotá, Colombia  
2019**

**Análisis de la mutación BRAF V600E en una  
serie de pacientes con  
Histiocitosis de Células de Langerhans del  
Hospital de la Misericordia**

**Edna Rocío Quintero Barbón**

**Trabajo presentado para optar al título de especialista en Patología  
Anatómica y Clínica**

**Director:  
Dra. Lina Eugenia Jaramillo Barberi**

**Codirector:  
Dr. Juan José Yunis Londoño**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Patología  
Bogotá  
2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Departamento de Patología de la Fundación HOMI Hospital La Misericordia quienes me aportaron toda la información y material correspondiente de los casos que fueron considerados para la ejecución de este estudio.*

*Al Laboratorio de Patología Interfacultades y sección de Inmunohistoquímica de la Universidad Nacional de Colombia por todo el apoyo brindado.*

*Al Laboratorio Servicios Médicos Yunis Turbay y Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSiGMol), por su inmensa colaboración en el análisis molecular.*

*A mis directores quienes con su constante consejo y enseñanzas que permitieron culminar este estudio con éxito.*

*Edna Rocío Quintero B.*

# Resumen

La Histiocitosis de células de Langerhans (HCL) es una enfermedad de comportamiento clínico variable y etiopatogenia desconocida. Desde 2010 se ha informado que 38-64% de todos los casos de HCL albergan la mutación activadora BRAFV600E, pero su significado clínico es incierto; por tanto, se buscó caracterizar las variables demográficas y clínicas de una serie de niños con diagnóstico de HCL para hacer una correlación con la presencia de esta mutación. Esto se hizo por medio de Inmunohistoquímica con el Anticuerpo VE1 usando una escala semicuantitativa y Secuenciación de Sanger en pacientes con diagnóstico confirmado de HCL. Se analizaron un total de 50 pacientes (edad promedio: 41 meses), 48% con HCL monosistémica (n:24), 12% con HCL multisistémica sin compromiso de órgano de riesgo (n:6) y 40% con HCL con compromiso de órgano de riesgo (n:20). Con el Anticuerpo VE1 se obtuvo positividad para BRAF V600E en 54% de los casos; 34 de las 50 muestras fueron llevadas a análisis molecular por Secuenciación, y se encontró concordancia de 90,3% entre los dos métodos utilizados para evaluar la mutación. Tanto en el estudio de Inmunohistoquímica como en el de secuenciación, se encontró una diferencia estadísticamente significativa de BRAFV600E con la edad de presentación (<2años vs > 2 años) ( $p= 0,021$  y  $p=0.011$  respectivamente); no hubo correlación estadísticamente significativa con tipo de HCL o con presencia de secuelas, riesgo de recaída o mortalidad. Las muestras con tinción débil por Inmunohistoquímica para BRAFV600E (1+) requieren confirmación por medio de un método molecular.

**Palabras Clave: Histiocitosis de Células de Langerhans, Mutación BRAF V600E, Inmunohistoquímica Ventana VE1, Secuenciación de Sanger**

# Abstract

Langerhans cell histiocytosis (LCH) is a disease of variable clinical behavior and unknown pathogenesis. Since 2010 it has been reported that 38-64% of all cases of HCL harbor the BRAFV600E activating mutation, but its clinical significance is uncertain; therefore, we sought to characterize the demographic and clinical variables of a series of children diagnosed with HCL to make a correlation with the presence of this mutation. This was done through Immunohistochemistry with the VE1 Antibody using a semiquantitative scale and Sanger Sequencing in patients with a confirmed diagnosis of HCL. A total of 50 patients were analyzed (average age: 41 months), 48% monosystemic LCH (n: 24), 12% multisystemic LCH without risk organ involvement (n: 6) and 40% LCH with risk organ involvement (n: 20). With the VE1 Antibody, positivity was obtained for BRAF V600E in 54% of the cases; 34 of the 50 samples were taken to molecular analysis by sequencing, and 90.3% concordance was found between the two methods used to evaluate the mutation. Both in the Immunohistochemical study and in the sequencing study, a statistically significant difference of BRAFV600E was found with the age of presentation (<2 years vs > 2 years) ( $p = 0.021$  and  $p = 0.011$  respectively); there was no statistically significant correlation with type of LCH or with the presence of sequelae, risk of relapse or mortality. Samples with weak staining by Immunohistochemistry for BRAFV600E (1+) require confirmation by means of a molecular method.

**Keywords: Langerhans Cell Histiocytosis, BRAF V600E Mutation, Venatana VE1 Immunohistochemistry, Sanger Sequencing**

# Contenido

1. Introducción .....	9
2. Justificación .....	10
3. Objetivos.....	11
4. Marco teórico: Histiocitosis de Células de Langerhans .....	12
4.1 Generalidades .....	12
4.2 Epidemiología.....	13
4.3 Etiopatogenia.....	13
4.4 Diagnóstico.....	15
4.5 Clasificación clínica .....	18
4.6 Tratamiento .....	19
4.7 Complicaciones y secuelas permanentes .....	21
4.8 Mutaciones puntuales y HCL: BRAF V600E .....	22
5. Materiales y métodos.....	27
6. Resultados.....	29
6.1 Fase 1: Caracterización de la población .....	29
6.2 Fase 2: Análisis de la mutación BRAF V600E por estudio de inmunohistoquímica con el anticuerpo ventana VE1:.....	33
6.3 Fase 3: Estudio molecular de la mutación BRAF V600E por medio de secuenciación de Sanger: .....	37
7. Discusión .....	46
8. Conclusiones .....	48
9. Consideraciones éticas.....	49
10. Referencias bibliográficas .....	50

# Lista de Figuras

Figura 4-1. Lesión de Histiocitosis de Células de Langerhans. ....	16
Figura 4-2. Tratamiento Enfermedad de Bajo Riesgo (1): .....	20
Figura 4-3. Tratamiento Enfermedad de Alto Riesgo (1): .....	20
Figura 6-1: A. Tipo de HCL, B: Órganos comprometidos y C: Evolución clínica.....	30
Figura 6-2. Kaplan Meier: probabilidad de recaída y supervivencia .....	32
Figura 6-3. Inmunohistoquímica para BRAF V600E con Anticuerpo Ventana VE1. Escala de evaluación.....	34
Figura 6-4. Resultados de evaluación por Inmunohistoquímica para BRAF V600E – Ventana VE1 .....	35
Figura 6-5. Inmunohistoquímica para BRAF V600E con Ventana VE1 y su correlación con tipo de HCL.....	36
Figura 6-6. Productos de amplificación: Gel de electroforesis.....	38
Figura 6-7. Resultados de secuenciación para BRAF V600E .....	39
Figura 6-8. Casos dudosos / no interpretables por secuenciación para BRAF V600E .....	40
Figura 6-9. Correlación de BRAF V600E por inmunohistoquímica con secuenciación de Sanger.....	41
Figura 6-10. Casos discordantes con inmunohistoquímica 2+ con secuenciación para BRAF V600E negativa .....	42
Figura 6-11 A. Tipo de HCL y B. Edad (pacientes menores vs mayores de 2 años) con respecto a la mutación BRAF V600E por secuenciación .....	45

# Lista de Tablas

Tabla 4-1. Clasificación clínica de la HCL de acuerdo a Sociedad del Histiocito LCH-III..	18
Tabla 4-2. Características clínicas y demográficas de pacientes con HCL.....	21
Tabla 6-1. Características clínicas y demográficas de pacientes con Histiocitosis de Células de Langerhans .....	33
Tabla 6-2. Inmunohistoquímica para BRAF V600E (Ventana VE1) en correlación con características clínicas y demográficas en HCL .....	37
Tabla 6-3. Casos dudosos / no interpretables por secuenciación para BRAF V600E.....	40
Tabla 6-4. Casos discordantes con inmunohistoquímica 2+ con secuenciación para BRAF V600E negativa .....	41
Tabla 6-5. Casos con tinción equivocada por inmunohistoquímica en correlación con resultados de secuenciación.....	43
Tabla 6-6. Estado mutacional de BRAF V600E (secuenciación de Sanger) en correlación con características clínicas y demográficas en HCL .....	44



# 1.Introducción

La Histiocitosis de células de Langerhans (HCL) es una patología considerada rara, cuya etiología aún no es clara y su presentación clínica es variable abarcando desde un comportamiento benigno hasta casos fatales. La HCL con clasificación de alto riesgo, con compromiso de órganos como hígado, bazo y medula ósea presenta tasas de mortalidad del 20% a 5 años.

En el año 2010 Badalian-Very y col reportan la mutación recurrente en BRAF V600E en 57% de muestras estudiadas de pacientes con HCL, una mutación característica de procesos neoplásicos como son el melanoma, el carcinoma papilar de tiroides y carcinoma colorrectal, entre otros; desde entonces en diferentes estudios posteriores se han reportado variables tasas de prevalencia entre el 38-64% de esta mutación activadora en casos de HCL. En algunos estudios se ha mostrado relación de la presencia de BRAF V600E con la presentación de la enfermedad a temprana edad y alto riesgo de recaídas, ambos factores de mal pronóstico en estos pacientes.

En Colombia se desconocen las características de la población con HCL, y por tal motivo con este proyecto quisimos hacer una caracterización de un grupo de pacientes con Histiocitosis de células de Langerhans de la Fundación Hospital de La Misericordia, el hospital pediátrico más grande del país, en un periodo de 12 años, en quienes además investigamos la presencia de la mutación BRAF V600E por medio de dos técnicas validadas, como son la Inmunohistoquímica y la Secuenciación de Sanger, para finalmente establecer una posible correlación clínica.

## 2. Justificación

Siendo la Histiocitosis de células de Langerhans (HCL) una enfermedad poco entendida, y al asociarse con la presencia de una mutación somática recurrente asociada a cáncer, como es BRAF V600E, se empiezan a dilucidar los posibles mecanismos que expliquen la variabilidad en el comportamiento de esta enfermedad, y asimismo con su amplio espectro pronóstico. El hallazgo de esta mutación activadora representaría además un nuevo blanco terapéutico y un potencial marcador en el seguimiento de pacientes tratados por esta enfermedad.

En nuestro medio, son escasos los reportes de series de casos de pacientes con Histiocitosis de células de Langerhans, y no existe alguna publicación en la que se haya hecho la identificación de la mutación BRAF V600E en pacientes con diagnóstico de HCL, ni correlación con las características clínicas.

En la Fundación Hospital de la Misericordia se ha observado que en los últimos años, la HCL se viene presentando cada vez más en los pacientes pediátricos de menor edad, con un mayor número de casos de HCL multisistémica de alto riesgo, que conlleva una mayor morbimortalidad, a pesar de los esquemas de tratamiento instaurado, y esto podría o no estar asociado a la presencia de la mutación BRAF V600E. Es por eso que quisimos estudiar la presencia de esta mutación en casos confirmados de HCL, que incluyan todo el espectro de la enfermedad: HCL monosistémica con compromiso aislado de piel o hueso, HCL multisistémica sin compromiso de los órganos de riesgo, y HCL multisistémica con compromiso de los órganos de riesgo, para poder hacer una comparación entre estos grupos, y establecer otras asociaciones clínicas con la presencia de la mutación.

# 3. Objetivos

## 3.1 Objetivo general

Caracterizar las variables demográficas y clínicas de una serie de niños con diagnóstico de Histiocitosis de células de Langerhans del Hospital de la Misericordia, y posteriormente hacer una correlación con la presencia de la mutación BRAF V600E.

## 3.2 Objetivos específicos

- Describir las características demográficas y clínicas de niños con diagnóstico de Histiocitosis de Células de Langerhans
- Identificar la mutación BRAF V600E por medio de inmunohistoquímica y secuenciación en muestras de pacientes con diagnóstico de HCL
- Comparar la expresión de BRAF V600E con su estado mutacional en pacientes con HCL
- Investigar la correlación entre esta mutación y las características clinico-patológicas de la HCL.

# 4.Marco teórico: Histiocitosis de Células de Langerhans

## 4.1 Generalidades

La histiocitosis de células de Langerhans (HCL) es una rara enfermedad, de etiopatogenia desconocida, que puede presentarse a cualquier edad, pero tiene predominancia en la población pediátrica. Se caracteriza por la formación de lesiones tisulares con acumulación de células dendríticas inmaduras CD1a+, langerina/CD207+ denominadas “células de HCL”, mezcladas con eosinófilos, células T policlonales, macrófagos activados y células gigantes multinucleadas, haciendo que estas lesiones tengan una composición celular y distribución anatómicas heterogéneas (1).

Cualquier órgano o sistema puede verse afectado por la HCL, y los más frecuentemente involucrados son: el hueso (80%), la piel (33%) y la glándula pituitaria (25%). En niños el compromiso de ganglios linfáticos y pulmones es muy raro. Este último se presenta más en pacientes adultos fumadores (2).

La HCL muestra una distribución específica según el órgano afectado; por ejemplo, en la piel el proceso inflamatorio desarrolla en la dermis papilar respetando la epidermis, en los ganglios linfáticos, el compromiso sinusoidal se observa en las lesiones más tempranas, en el hígado, hay una predilección por el epitelio de los conductos biliares de gran calibre, en el pulmón la HCL muestra compromiso peribronquial (3).

Las lesiones frecuentemente regresan espontáneamente o posterior a tratamiento local. A pesar de heterogeneidad clínica no hay distinción histológica, y existen presentaciones clínicas pleiotropicas desde lesiones simples tratadas con curetaje hasta una enfermedad multisistémica fatal(4).

## **4.2 Epidemiología**

Las causas y factores de riesgo para el desarrollo de la Histiocitosis de Células de Langerhans son poco claros; estudios poblacionales han mostrado diferencias en la incidencia de la enfermedad de alto riesgo entre razas y grupos étnicos; así en las diferentes series de casos se ha reportado: La incidencia estimada de HCL en una población de Estocolmo fue de 8.9 casos por millón de habitantes menores de 15 años por año (5); en Estados Unidos se ha reportado incidencia de 0.05 a 5 casos por millón de habitantes al año; en la población de Latinoamérica existen pocos casos reportados, se calcula una incidencia de 4,5 casos por millón de habitantes(6).

La edad pico de presentación esta entre 1-3 años, y la relación hombre: mujer ha sido variable entre los reportes. Se ha observado asociación familiar con una incidencia aumentada en gemelos monocigóticos de pacientes afectados, lo que ha sugerido una predisposición de línea germinal en algunos de los casos(5, 7).

Se han descrito la correlación entre el desarrollo de la enfermedad y varios factores que incluyen: infecciones maternas y neonatales, esquema de vacunación incompleto, historia familiar de enfermedad tiroidea, fertilización in vitro, problemas de alimentación, transfusiones durante la infancia y condiciones socioeconómicas desfavorables (5, 7, 8).

Así, los estudios poblacionales han mostrado variaciones en la incidencia de la HCL por raza, grupo étnico y factores socioeconómicos, y apuntan a la necesidad de realización de estudios epidemiológicos analíticos que proporcionen información sobre factores asociado a la causalidad de esta enfermedad (7).

## **4.3 Etiopatogenia**

Las lesiones de la HCL se caracterizan por contener varios tipos de células inflamatorias además de las células patológicas características, siendo lesiones heterogéneas y policlonales; pero hablando específicamente de las células patológicas de la HCL, en 1994 dos estudios independientes liderados por Yu y Willman, utilizaron la lionización, por

medio del ensayo de inactivación de cromosoma X, en muestras de 3 y 10 pacientes con HCL, respectivamente, y en ambos se demostró clonalidad de las células de HCL (9, 10).

La acumulación de histiocitos patológicos de carácter clonal, ha generado controversia respecto al mecanismo subyacente responsable, que sumado a los recientes hallazgos de mutaciones somáticas activadoras, particularmente BRAF V600E y MAP2K1 en aproximadamente el 75% de los pacientes, ha sugerido la posible naturaleza neoplásica de la enfermedad, a diferencia de otras teorías que indican que se trata de una reactividad a estímulo inmunológico (1). Con respecto a esto último, dada la naturaleza granulomatosa de las lesiones, que generalmente poseen morfología benigna se ha sugerido una patogénesis infecciosa, ambiental o autoinmune. Se ha descrito una respuesta inmune y expresión de citoquina anormales, como deficiencia de linfocitos T supresores circulantes, y altos niveles de factores estimulantes de colonias de macrófagos y granulocitos, e interleuquina 17, lo cual se ha denominado “Tormenta de citoquinas”(11).

La célula de origen de la enfermedad es cuestionada. Dada la presencia de gránulos de Birbeck, la expresión del marcador CD207 y la similitud fenotípica con las células de Langerhans de la epidermis inicialmente, Nezelof en 1973 propuso que esta enfermedad es de origen epidérmico (1, 4). Sin embargo en el año 2010, Allen y col, analizaron 15 muestras de pacientes con diagnóstico de HCL por medio de la tecnología de microarrays, con el uso del chip Affymetrix, y observaron que las células patológicas de HCL, mostraron 2113 genes expresados diferencialmente en comparación de las células epidérmicas de Langerhans CD 207+, y más bien tenían un perfil de expresión genética más similar al de precursores inmaduros de células dendríticas derivados de la médula ósea, además de la expresión del gen de la osteopontina, SPP1, importante en la activación y reclutamiento de linfocitos T a los sitios de inflamación. Estos resultados sugirieron un modelo de patogénesis de HCL de “precursor de célula dendrítica erróneo”, en el que las lesiones son debidas a un acumulo de células dendríticas mieloides inmaduras derivadas de la medula ósea que reclutan células inflamatorias, que se diferenciaba del modelo inicial de “célula inmadura activada”(12) .

Berres y col, en el año 2014, realizaron genotipificación en 100 muestras de HCL y se encontró que pacientes con enfermedad activa de alto riesgo, con presencia de la mutación de BRAF V600E en células circulantes en sangre periférica con marcador

CD11c+ Y CD14+ y en células progenitoras de células hematopoyéticas de la medula ósea CD34+, mientras que en pacientes con enfermedad de bajo riesgo la mutación se limitó a células de origen epidérmico CD207+. De esta forma, se plantea que la HCL de alto riesgo surge por mutaciones de un progenitor hematopoyético, mientras que la enfermedad de bajo riesgo se debería a la mutación somática de precursores de células dendríticas de restricción a tejido (piel) (4).

La ausencia de un modelo animal que reproduzca fielmente la HCL ha impedido el planteamiento y evaluación de hipótesis acerca de la patogénesis, así como de potenciales nuevos tratamientos (13).

## **4.4 Diagnóstico**

Entre los síntomas específicos que estos pacientes presentan se encuentran: dolor, edema, rash cutáneos, otorrea, fiebre, pérdida de apetito, diarrea, pobre ganancia de peso, falla en el crecimiento, polidipsia, poliuria, síntomas respiratorios, irritabilidad, cambios neurológicos y del comportamiento (2).

El diagnóstico se basa en el examen histopatológico e inmunofenotípico de la lesión tisular, de acuerdo con la presentación clínica, y hallazgos radiológicos. La HCL tiene una apariencia histológica característica con la tinción de Hematoxilina-Eosina, pero para un diagnóstico definitivo debe haber positividad para CD1a y/o CD207 (Langerina) correlacionado con la presencia ultra estructural de los gránulos de Birbeck (2). La formación de gránulos de Birbeck en las células dendríticas de la HCL, similares a los presentes en las células de Langerhans epidérmicas representarían la captura de antígeno por parte del receptor de lectina II tipo C, llamado langerina o CD207 (4).

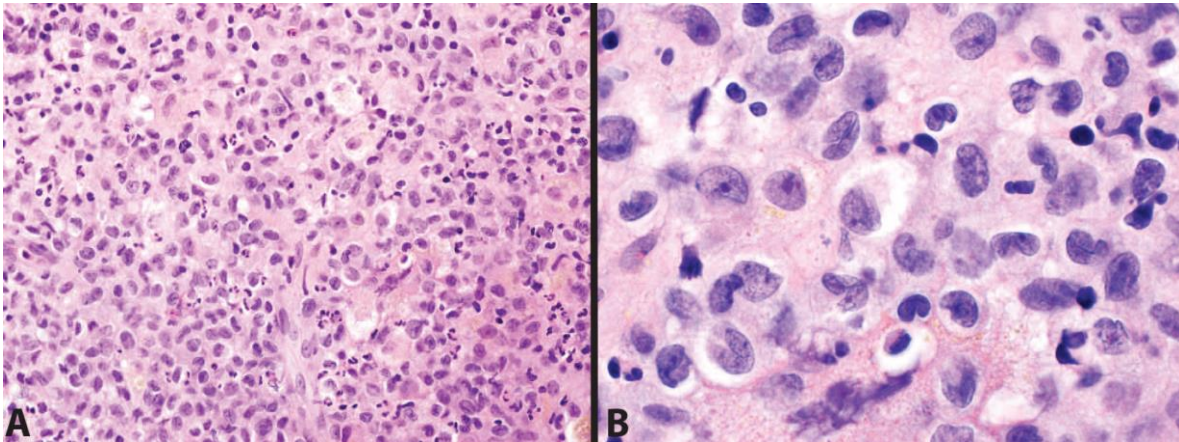


Figura 4-1. Lesión de Histiocitosis de Células de Langerhans.

A. Infiltrado de células grandes con abundante citoplasma eosinofílico y núcleo irregular. Fondo de Neutrófilos, linfocitos e histiocitos espumosos. B. Prominentes pliegues y hendiduras nucleares, cromatina fina, nucléolo pequeño/ Indistinto (14)

En los pacientes en quienes la realización de la biopsia puede resultar peligrosa, como en el compromiso aislado de un cuerpo vertebral, se debe hacer una monitorización con imágenes diagnósticas por lo menos en los siguientes 6 meses, reevaluando la posibilidad de realizar la biopsia confirmatoria del diagnóstico (2).

Se requiere una extensa evaluación bioquímica e imagenológica en el momento del diagnóstico y de presentación de una reactivación de la enfermedad para decidir la más adecuada aproximación terapéutica; esta evaluación incluye: conteo total sanguíneo (conteo celular y diferencial de glóbulos blancos, hemoglobina, contero de plaquetas), química sanguínea (proteínas totales, albumina bilirrubina, ALT, AST, gammaGT, creatinina, electrolitos), tasa de eritrosedimentación, ultrasonido abdominal (medición de tamaño estructura de hígado y bazo), estudios de coagulación (INR/PT, APTT/PTT, Fibrinógeno/factor I), radiografía de tórax, radiografía de huesos largos. (15).

Existen varios criterios para determinar el compromiso de un órgano como son(2):

- Hueso: compromiso general. Compromiso huesos craneofaciales: lesiones en órbita, huesos temporal, mastoideo, esfenoidal, cigomático o etmoides; lesiones en hueso maxilar o senos paranasales; lesiones en fosa craneana como extensión



intracraneana de tejidos blandos. Afectación vertebral con o sin extensión a tejidos blandos.

- Piel: cualquier rash documentado por examen histológico o cualquier lesión eritematosa, maculas, pápulas o nódulos costrosos, con o sin ulceración, o petequias, o un cuadro similar a dermatitis seborreica.
- Ganglios linfáticos
- Mucosas: gomas o lesiones en mucosa oral. Afectación genital o anal.
- Oído: otitis externa, otitis media, otorrea
- Ojo: compromiso de orbita con proptosis o exoftalmos
- Pulmón: nódulos o quistes en TAC, evaluación por lavado bronquialveolar o biopsia.
- Sistema nervioso central hipotalámico-pituitaria: cualquier deficiencia hormonal de la pituitaria o aparición de tumor en el eje hipotálamo-hipófisis
- Bazo: mayor de 3 cm por debajo de reborde costal en la línea medio claviclar, confirmado por ultrasonido
- Hígado: agrandamiento mayor de 3 cm por debajo de reborde costal a nivel de línea medio claviclar, confirmado por ecografía, o disfunción documentada: hiperbilirrubinemia mayor de 3 veces el valor normal, hipoalbuminemia menor de 30 g/dL, gamma GT aumentada más de 2 veces del valor normal, aumento en los valores de ALT-AST por encima de 3 veces del normal, ascitis, edema, o masa nodular intrahepática.
- Sistema hematopoyético: compromiso moderado: hemoglobina de 7-10 g/dL y trombocitopenia entre 20000 – 100000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Compromiso severo: hemoglobina menor de 7 g/dL y conteo de plaquetas menor de 20000/mm<sup>3</sup>.

Actualmente no existe un marcador biológico específico de la enfermedad. La afectación de ciertos órganos es considerada un marcador de alto riesgo de mortalidad o de desarrollo de complicaciones neurodegenerativas, que son irreversibles y con un curso clínico debilitante. Los órganos de alto riesgo son: medula ósea, hígado y bazo. Confieren tasas de mortalidad mayores del 20%. La HCL de bajo riesgo tiene supervivencia cercana al 100%. El compromiso pulmonar también se ha asociado a alta mortalidad, en medio de complicaciones mecánicas como neumotórax no controlado o debido a cambios enfisematosos crónicos, pero es poco frecuente en niños (2, 4).

## 4.5 Clasificación clínica

Se distinguen dos tipos de HCL: de compromiso de un solo sistema (SS-LCH) y enfermedad multisistémica (MS-LCH). La HCL de compromiso de un solo sistema se clasifica en: afectación unifocal o multifocal de órgano o sistema, compromiso unifocal o multifocal de hueso, compromiso de piel, compromiso de ganglios linfáticos, afectación de sistema nervioso central/hipotálamo/hipófisis, y compromiso de otros órganos, como por ejemplo tiroides. En la enfermedad multisistémica se afecta 2 o más órganos o sistemas, sean órganos de bajo o alto riesgo (1).

Tabla 4-1. Clasificación clínica de la HCL de acuerdo a Sociedad del Histiocito LCH-III.

Clasificación clínica de la HCL de acuerdo a Sociedad del Histiocito LCH-III (5)			
GRUPO CLINICO	SISTEMA AFECTADO	ORGANOS AFECTADOS	PRONÓSTICO
1	Multisistémica – Alto Riesgo	Cualquier órgano de riesgo comprometido: Hígado, Bazo, Medula Ósea, Disfunción Hematológica	Tasa de Mortalidad 20%, Pese a tratamiento instaurado
2	Multisistémica – Bajo Riesgo	Compromiso >2 órganos, sin órgano de riesgo	Tasas de supervivencia cercanas a 100%
3	Monosistémica – Multifocal O Sitio Especial	2 lesiones en un órgano Óseo con extensión a tejidos blandos intracraneal o intraespinal	Secuelas a corto y largo plazo
	Monosistémica – Unifocal	1 lesión en un órgano	

## 4.6 Tratamiento

La decisión sobre el tratamiento más adecuado depende de los síntomas clínicos, la localización de las lesiones y su tamaño. En la enfermedad con afectación de un solo sistema el paciente es referido al especialista de acuerdo a la localización del órgano afectado. Para lesiones óseas unifocales, la regresión espontánea puede ocurrir. En el compromiso multifocal de hueso son frecuentes las reactivaciones, pero muestran tasas de supervivencia del 100% aproximadamente, con tratamiento que varía desde la observación clínica hasta quimioterapia, siendo la combinación de esteroides y Vinblastina (VBL) más frecuentemente usada(2).

Cuando hay compromiso cutáneo aislado es frecuente la regresión espontánea, pero tiene el potencial de progresar a enfermedad multisistémica, por lo que debe hacerse una monitorización juiciosa reevaluando la necesidad de tratamiento.

La HCL multisistémica requiere de terapia sistémica haya o no compromiso de los órganos de riesgo, para el control de la actividad de la enfermedad, disminución de las reactivaciones, y reducir las consecuencias permanentes. Los diversos protocolos internacionales concluyen un tratamiento estándar con esteroides y vinblastina, que si es prolongado por al menos 1 año se reduce el riesgo de reactivaciones, y la evaluación de una adecuada respuesta al mismo luego de las primeras 6 semanas de tratamiento en un buen marcador de la evolución de la enfermedad (2).

Figura 4-2. Tratamiento Enfermedad de Bajo Riesgo (1):

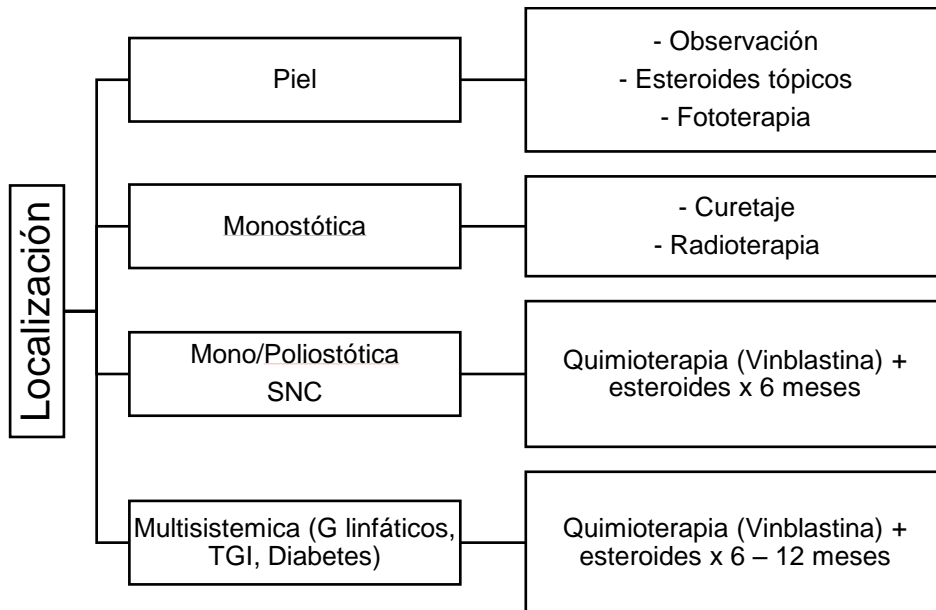
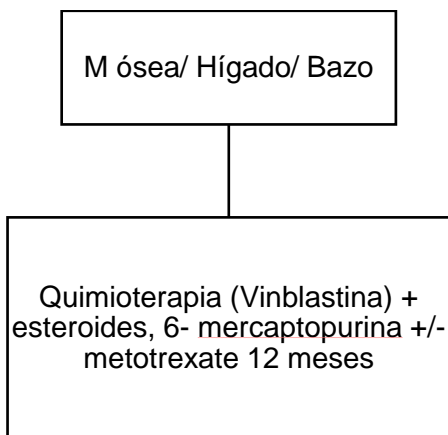


Figura 4-3. Tratamiento Enfermedad de Alto Riesgo (1):



## 4.7 Complicaciones y secuelas permanentes

Algunas de las secuelas permanentes de la HCL pueden estar presentes al momento del diagnóstico o pueden manifestarse muchos años después. Más frecuentemente involucran a los sistemas endocrino y óseo(2).

La Diabetes insípida es la endocrinopatía más frecuentemente asociada con presentación desde el 15-30% de los pacientes con HCL, pero también puede haber deficiencia de la hormona de crecimiento hasta en un 10% y otras hormonas que pueden llevar a panhipopituitarismo y afectación de la pubertad. En cuanto secuelas óseas, se puede desarrollar escoliosis cuando múltiples vertebras están afectadas; cuando el compromiso es facial puede llevar a asimetrías que requieran manejo quirúrgico reconstructivo; las lesiones en hueso temporal pueden conducir a pérdida de audición por compromiso de oído medio o interno. Las consecuencias neurológicas incluyen ataxia cerebelosa dificultades para el aprendizaje. Secuelas en otros órganos como pulmones e hígado son más raras pero pueden causar morbilidad seria(2) .

Tabla 4-2. Características clínicas y demográficas de pacientes con HCL

<b>Tasa de Incidencia ajustada por edad</b>	<b>0,8 – 4,6/ millon/ año (0-15 años)</b>
Edad promedio de dx	1-3,5 años
Radio H/M	0.76 – 1,5
Clasificación	HCL Monosistémica: 69.85% HCL Multisistémica: 15-30%
Órganos	Compromiso óseo hasta en un 90% Compromiso cutáneo hasta en un 50% Compromiso de Órgano de Riesgo hasta en 18%
Recaídas	18-20% de los pacientes. Predominio de compromiso óseo
Secuelas	15%: Diabetes Insípida, la más frecuente
Mortalidad	3-4% : Progresión de la enfermedad, Complicaciones relacionadas con el tratamiento

Guyot-Goubin. 2008/Salotti. 2009/Venkatramani. 2012/Ribeiro. 2015/Kim.2014/Lee. 2015

## 4.8 Mutaciones puntuales y HCL: BRAF V600E

Gracias a los avances en tecnologías de genómica se puede efectuar la búsqueda de mutaciones en archivos de muestras de tejidos fijados en formalina-incluidos en parafina, sin que sea necesario contar con material fresco congelado, como por ejemplo el genotipado basado en espectrometría de masas, que se separa e identifica moléculas con diferentes masas moleculares. Basado en este principio, por medio de la herramienta Oncomap, un ensayo capaz de testear la presencia de cerca de 1000 alelos de 140 genes relacionados con cáncer, lo que le da una alta sensibilidad para el examen de neoplasias raras. Baladrian- Very y col., en el año 2010, realizaron un estudio que utilizó una versión de Oncomap que evaluaba 983 mutaciones en 115 genes, examinando 61 casos de archivo de HCL. Ellos reportaron la primera mutación genética somática recurrente en HCL, presente en un 57% de las muestras: la mutación de BRAF-V600E. Esta mutación fue confirmada por la técnica de pirosecuenciación (4, 13).

B-RAF es una proteína quinasa activada por receptores tirosina quinasa acoplados a Ras (RTK), que pertenece a la familia RAF, y es fundamental en la vía de señalización de la Quinasa activada por Mitógeno (MAPK). En células normales la actividad de esta vía es controlada por mitógenos como factores de crecimiento, citoquinas, y hormonas que se ligan a receptores de superficie celular. Posteriormente, se activa RAS, una proteína G de la superficie interna de la membrana plasmática, que a su vez se une y activa a RAF, y ésta fosforila a sus blancos MEK y ERK quinasa que finalmente modulan la expresión genética, coordinando una gran variedad de respuestas celulares involucradas en el desarrollo, regulación del ciclo celular, proliferación celular y diferenciación, supervivencia celular y apoptosis, y otros procesos fisiológicos (16, 17).

La mutación puntual de B-RAF V600E, se considera de origen somático y no de línea germinal, debido a que la hiperactivación de esta proteína en el periodo embrionario resulta letal en modelos animales. Representa una sustitución de valina por ácido glutámico en la posición 600, lo cual activa fuertemente a la proteína B-RAF; además se asocia a altos niveles de ciclina D1, mediando la proliferación celular, y podría así contribuir a la iniciación tumoral, aunque su presencia no es sinónimo de cáncer (16). En humanos la mutación somática activadora de B-RAF ha sido encontrada en numerosos tumores benignos y malignos entre los que se incluyen: nevus benigno, melanoma,

carcinoma colorrectal y de pulmón, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma ovárico de bajo grado y glioma pediátrico de bajo grado; entre las mutaciones identificadas, V600E es la más frecuente (17).

El hallazgo de la mutación recurrente de B-RAF V600E en los especímenes de HCL se explicaría como un oncogen transformante en las células de Langerhans, que le brindaría una ventaja proliferativa llevando al desarrollo de una lesión clonal. Sin embargo esta afirmación requiere de la demostración de la mutación específicamente en estas células en medio de una población celular heterogénea, pero esto se ha inferido por la abundancia de material celular rico en CD1a, y posterior micro disección por láser (13). Se ha visto que es necesario que las muestras tengan al menos un 10% de representación de las células tumorales, para que puedan ser identificadas con problemas con cualquier de los métodos disponibles en el mercado (18). Dado que la identificación precisa de las mutaciones somáticas subyacentes es esencial, un estudio evaluó la sensibilidad, especificidad y viabilidad de seis métodos diferentes para la detección de mutaciones BRAF, estableciendo que los métodos moleculares como el High Resolution Melting (HRM) y la secuenciación de Sanger no hubo diferencia en la sensibilidad (98%) y que todas las mutaciones con hasta el 6,6% de frecuencia de alelos se pudieron detectar con un 100% de especificidad. Otro método como la pirosecuenciación detectó el 100% de las mutaciones hasta un 5% de frecuencia de alelos, pero exhibió solo un 90% de especificidad. La PCR alelo-específica no pudo detectar el 16,3% de las mutaciones elegibles para la terapia con vemurafenib. La secuenciación de próxima generación (NGS) pudo analizar el 100% de los casos con un 100% de especificidad pero mostró una sensibilidad del 97.5%. La Inmunohistoquímica obtuvo un buen rendimiento, dada la rareza de reactividad cruzada con otras mutaciones BRAF (19). Actualmente los métodos moleculares que se consideran más sensibles para la detección de esta mutación son la PCR digital y la PCR en tiempo real (18).

La identificación de la expresión de la mutación activadora de BRAF V600E por medio de inmunohistoquímica usando un anticuerpo validado VE1, se correlaciono con el estado mutacional en la mayoría de los casos en el estudio de Roden y col, tanto en pacientes con HCL pulmonar y extrapulmonar, obteniendo un índice de correlación del 95.6% entre las dos técnicas; estudios posteriores como el de Mehes y col mostraron concordancia del 93% entre la inmunohistoquímica con este mismo anticuerpo y la secuenciación, precedida por PCR. Así, los estudios por inmunohistoquímica pueden ser usados como

test de tamización para esta mutación en HCL (20, 21). Para su evaluación es necesaria la tinción fuerte y uniforme del citoplasma, dado que la tinción nuclear se considera inespecífica. Se han planteado diferentes escalas de evaluación de la inmunotinción, siendo la más aceptada la propuesta por Ballester y col, que daba una calificación de 0 a 3+, dependiendo de la intensidad observada con diferentes aumentos con la microscópica óptica de luz (22).

El hallazgo de la mutación BRAF V600E representa una aproximación a la patogénesis de HCL: la identificación de las mutaciones activadoras del gen BRAF apoyan fuertemente la hipótesis que HCL es un proceso neoplásico, al menos en un porcentaje de casos (17), concordante con la presencia de acumulaciones de células clonales, inestabilidad cromosómica, acortamiento significativo de los telómeros comparados con células e Langerhans de otros procesos inflamatorios, la presencia de disregulación del ciclo celular dentro de las lesiones, reportados previamente (3).

En cuanto el significado clínico de portar esta mutación, los reportes en la literatura han mostrado resultado variables (23): en algunos la mutación BRAF V600E en HCL ha mostrado correlación con la edad, siendo más frecuente en tumores de pacientes menores de 10 años comparados con pacientes mayores, 76% versus 44%, respectivamente (13) y en otro se observó una mayor frecuencia de BRAF V600E en bebés menores de 2 años de edad ( $p = 0.013$ ) (18). Respecto al tipo de Histiocitosis de bajo o alto riesgo, no se ha mostrado una asociación directa, pero se ha demostrado positividad para BRAF V600E en pacientes con presentación clínica más agresiva, que incluye el Síndrome hemofagocítico (24). A pesar de no correlacionarse con la localización anatómica, compromiso de un solo sistema versus compromiso multisistémico en HCL, la mutación de BRAF V600E se ha encontrado en células dendríticas patológicas presentes en las lesiones, asociado con enfermedad de alto riesgo recurrente o refractaria. También ha estado presente en células circulantes, asociado a severidad de la enfermedad en HCL de alto riesgo, así el estado mutacional estaría asociado con mayor resistencia a la quimioterapia de primera línea (25). Su expresión se ha asociado con un riesgo incrementado de recurrencia, y se ha encontrado presente en las fracciones circulantes de células CD11c+ y CD14+ y células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de pacientes catalogados de alto riesgo; por el contrario, la mutación se restringe a células dendríticas CD207+ en pacientes de bajo riesgo; a pesar de tener una etiología desconocida, el modelo de precursores de células dendríticas



mieloides proporciona un mecanismo subyacente para explicar la localización y acumulación anormales de células dendríticas, y esto es consistente con el tratamiento de la HCL como enfermedad hematológica (al menos en casos pediátricos). Esto contrasta con los tumores sólidos primarios y metastásicos, que tienden a presentar un mayor nivel de heterogeneidad a nivel genético (26). En modelos animales de ratones, la expresión de BRAF V600E en precursores de células dendríticas induce el fenotipo de HCL, a diferencia de lo que ocurre con células diferenciadas (4). Por otra parte, se ha identificado la relación entre la mutación BRAF V600E y un microambiente inmunitario tumoral supresivo en la HCL, lo que da como resultado la interrupción de la vigilancia inmunitaria del huésped-tumor, que abre la puerta al uso inmunoterapia con terapia dirigida a BRAF en estos pacientes (27) .

La HCL es una neoplasia clonal y el hallazgo de la mutación BRAF V600E y su consecuente desregulación en la vía RAS-RAF-MAPK representa prometedoras aproximaciones terapéuticas, como el uso de inhibidores de B-RAF, MEK o ERK, y hace necesario el evaluar la inhibición selectiva de esta vía, al menos en pacientes con las formas sistémicas y agresivas de la enfermedad. Adicionalmente su detección en una muestra de sangre tendría uso en el diagnóstico y monitorización en el seguimiento del tratamiento, al proporcionar información sobre el estado de enfermedad mínima residual, y además sus potenciales usos pronósticos (16). También puede conducir a la obtención de un modelo murino más preciso y de forma más fácil, para poder ampliar los estudios de esta enfermedad (1, 13).

El uso de Vemurafenib, un inhibidor de BRAF, mostró una buena respuesta clínica en pacientes con Histiocitosis de células de Langerhans y enfermedad de Erdheim- Chester, otro desorden relacionado con la mutación BRAF V600E en un 54% de los casos según el reporte de Haroche y col. La efectividad del tratamiento se vio particularmente en una paciente con HCL cutánea, donde las lesiones histiocíticas de piel resolvieron luego de pocos días de tratamiento, y se confirmó por biopsia. Las dosis iniciales de Vemurafenib desarrollaron efectos secundarios como rash, eritema cutáneo y queratosis pilar, que desaparecieron al reducir la dosis a la mitad. El esquema de dosis y duración de tratamiento para estas entidades deberá ser determinado por estudios clínicos, así como la eficacia a largo termino y desarrollo de posibles resistencias secundarias como en melanoma asociado a mutación BRAF V600E (28).

Independientemente del estado mutacional de BRAF, la activación de la vía RAF-MEK-ERK, parece ser una característica general de la HCL. Las proteínas MEK y ERK fosforiladas son un hallazgo constante y específico en células patológicas de HCL, evidenciado por medio de estudios de inmunofluorescencia, en presencia o ausencia de la mutación de BRAF, un hallazgo inesperado, pues en el 50% de los casos aproximadamente el origen de esta activación permanece desconocida, y podría estar asociada a una sobre activación del receptor tirosina quinasa, dependiente o independientemente del ligando. Esto sugiere que mutaciones en otros genes que regulan esta vía estarían involucrados en casos con alelos normales de BRAF y deberían ser investigados (13).

Esta observación se complementa con los hallazgos de Brown y col, quienes por medio de la tecnología de secuenciación de próxima generación reportaron la mutación somática de MAP2K1 en aproximadamente el 50% de los pacientes con HCL en quienes se reportó negatividad en la búsqueda de la mutación BRAF V600E, siendo 2 mutaciones mutuamente excluyentes y con posibles papeles importantes en la patogénesis de la HCL (29). Un trabajo similar por parte de Chakraborty, en el 2014, evaluó un espectro de mutaciones somáticas en enfermedades histiocíticas, incluyendo la Histiocitosis de células de Langerhans, encontrando la mutación BRAF V600E en el 50% de los pacientes, y en aquellos con BRAF silvestre, se encontró la mutación de MAP2K1 en el 33%, que incluían delecciones in-frame y mutaciones miss-sense, comprometiendo el dominio de autorregulación y núcleo catalítico de la proteína MEK1. Se reportaron además casos aislados de mutaciones somáticas de otros genes en la vía MAPK: ARAF, y ERBB3. Así la habilidad de los inhibidores de la vía MAPK, depende de cada mutación específica, al poner a prueba la respuesta a Vemurafenib (30). Otras mutaciones que se han encontrado en muestras de pacientes con HCL corresponden a mutación en TP53: R175H, un alelo transformante en KRAS: G13D, y un alelo transformante candidato en MET: E168D(13).

La mutación se ha considerado una clave que permitiría elucidar la patogénesis de esta enfermedad, sin embargo, aún son escasos los reportes que proporcionan información acerca de la prevalencia de la mutación BRAF V600E en la HCL: esto conduce a la necesidad de llevar a cabo estudios clínicos multicéntricos que evalúen a BRAF como blanco terapéutico y evaluación adicional de la asociación entre mutaciones del gen BRAF como sitio de enfermedad, estadio, respuesta clínica y resultados (17, 23).

## 5. Materiales y métodos

Tipo de estudio: Se trata de un estudio descriptivo que incluye la población de pacientes con diagnóstico histopatológico de Histiocitosis de Células de Langerhans, realizado en la Fundación Hospital de la Misericordia, durante los años 2005 a 2017.

### FASES DEL ESTUDIO

5.1 Serie de casos: Se revisaron el total de historias clínicas de pacientes con diagnóstico confirmado de Histiocitosis de células de Langerhans, reportados en los archivos del Departamento de Patología del Hospital de la Misericordia, en el periodo de 2005 al 2017.

Se tabularon las características demográficas y clínicas de niños con diagnóstico de Histiocitosis de Células de Langerhans atendidos en este lapso de tiempo:

- Variables cuantitativas: edad, tiempo de evolución, seguimiento
- Variables cualitativas: Procedencia, Sexo, Distribución de la afectación por órgano: evidencia histológica de órganos infiltrados por tumor (HCL) o criterios para compromiso Hematopoyético, Hígado, Bazo, Pulmón; Clasificación de la Sociedad del Histiocito; recaídas, secuelas permanentes y muertes.

Se seleccionaron los casos que tenían validez diagnóstica con positividad en el marcador de inmunohistoquímica CD1a+, considerado la prueba confirmatoria de esta enfermedad.

5.2 Análisis de la mutación BRAF V600E por estudio de Inmunohistoquímica: Se realizó la búsqueda de los bloques de parafina de los casos analizados, y en el material disponible se realizaron cortes de cada caso en láminas cargadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica en el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia, para lo cual se adquirió el Kit Optiview DAB IHC, para uso conjunto con el marcador de inmunohistoquímica Ventana VE1, para la identificación de la mutación BRAF V600E por medio del equipo automatizado BENCHMARK

GX, con los respectivos protocolos estandarizados; el uso de este kit de optimización es necesario para mejorar la sensibilidad del anticuerpo en la interpretación mediante microscopía óptica.

5.3 Estudio molecular de la mutación BRAF V600E por medio de secuenciación de Sanger: Se obtuvieron 4 cortes de 10 micras de cada caso y se prepararon las muestras para el análisis y confirmación molecular, aislando ADN a partir de los bloques de parafina por medio del Kit Comercial Zymo, y se determinó la concentración de ADN por medio de su cuantificación. Luego se llevó a proceso de amplificación por medio Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando primers específicos del exón 15 del gen BRAF, y se realizaron corridos en gel de electroforesis para determinar la calidad de las muestras a las que se les realizó procesos de purificación y secuenciación en el Servicio de secuenciación y análisis molecular (SSiGMol), en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional.

5.4 Análisis de resultados: se realizó la evaluación final de los resultados, comparando los hallazgos obtenidos por inmunohistoquímica y por secuenciación de Sanger, estableciendo su correlación con las variables clínicas descritas, por medio de análisis estadístico por medio de la herramienta XLSTAT, calculando las asociaciones estadísticamente significativas con el test exacto de Fisher y Chi cuadrado, y se estableció el porcentaje de concordancia entre las dos técnicas usadas para el estudio de la mutación BRAF V600E.

# 6.Resultados

## 6.1 Fase 1: Caracterización de la población

Con los casos recolectados de Histiocitosis de células de Langerhans (HCL) diagnosticados en la Fundación Hospital de La Misericordia en los últimos 12 años (2005-2017), positivos para el marcador de inmunohistoquímica CD1a, que es la prueba confirmatoria de la enfermedad, se obtuvo una muestra significativa de 50 pacientes, cada uno de ellos con acceso a sus historias clínicas, láminas de histopatología y bloques de parafina respectivos.

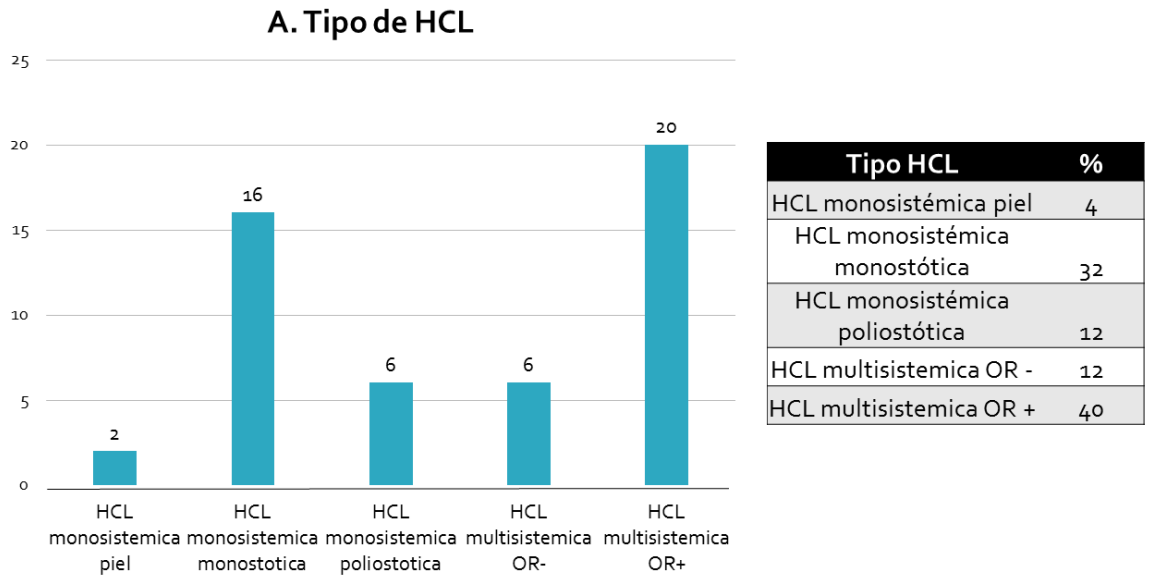
Inicialmente se hizo una revisión detallada de las historias clínicas en formato físico y electrónico, para describir las características demográficas y clínicas de nuestros pacientes, y se construyó una base de datos con esta información. Simultáneamente se realizó la revisión de las láminas histológicas de estos casos para verificar sus características histopatológicas; fue necesaria la obtención de nuevos cortes a partir de los bloques de parafina para algunos de los casos, con el fin de optimizar el tejido de las muestras que tenían áreas sin lesión por hemorragia o necrosis.

Los pacientes de los 50 casos analizados para el estudio se distribuyeron así: 54% fueron hombres (n:27) y 46% fueron mujeres (n:23); la edad promedio al momento del diagnóstico fue de 41 meses, con un rango de edad de 2 a 159 meses; el tiempo promedio de evolución de los síntomas fue de 16 semanas, con un rango de 1 a 107 semanas, esta variabilidad en correlación con la diferente afectación de órganos reportada; y el tiempo promedio de seguimiento fue de 35 meses, con un rango de 3 a 120 meses, y 3 pacientes no tuvieron ningún tipo de seguimiento en la institución.

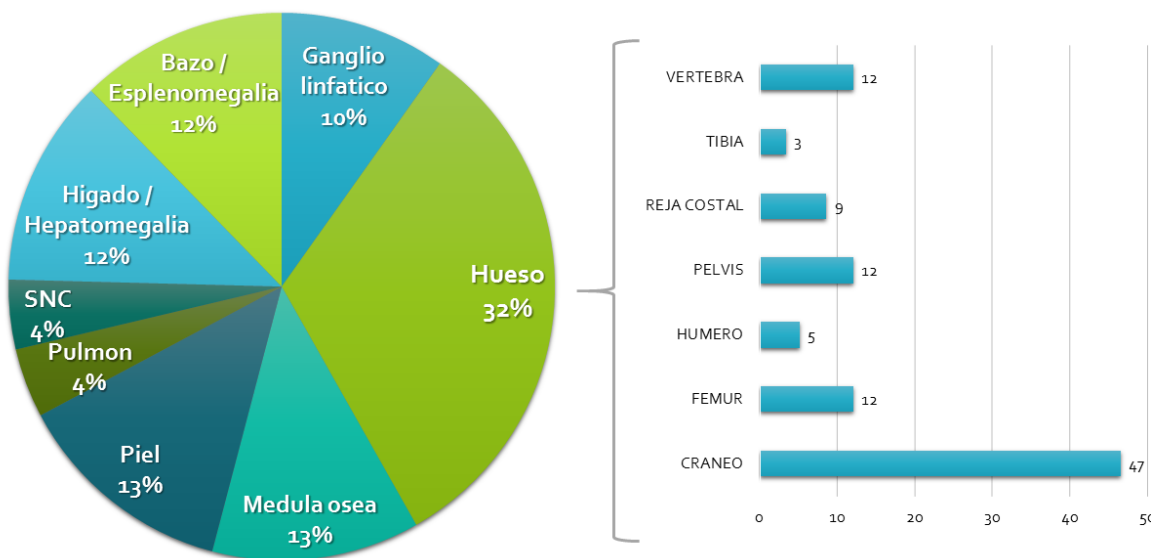
En cuanto a la clasificación de Histiocitosis según los criterios de la Sociedad del Histiocito, 4% de los casos fueron clasificados como HCL monosistémica con compromiso de piel (n:2), 32% como HCL monosistémica monostótica (compromiso óseo monofocal) (n: 16), 12% como HCL monosistémica poliestótica (compromiso óseo multifocal) (n:6), 12% como HCL multisistémica sin compromiso de órgano de riesgo (OR-) (n: 6) y 40% como HCL multisistémica con compromiso de órgano de riesgo (OR+: Hígado, Bazo y/o

medula ósea) (n:20). El órgano más afectado fue el hueso (32% de los órganos comprometidos) y la piel (13% de los órganos comprometidos), seguidos de los órganos considerados como órganos de riesgo y el compromiso a ganglio linfático; los huesos más afectados fueron los huesos craneales

Figura 6-1: A. Tipo de HCL, B: Órganos comprometidos y C: Evolución clínica



### B. Órganos comprometidos

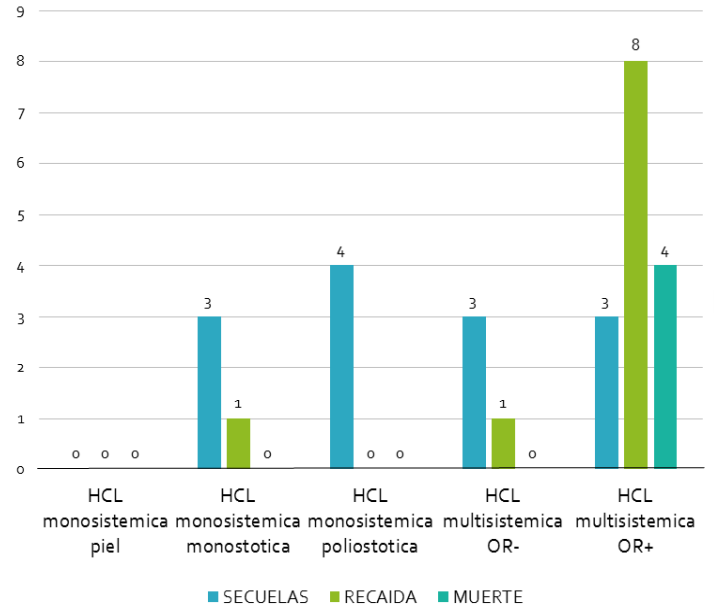


### C. Evolución clínica

	n	% sobre el Total de Pacientes con HCL
Secuelas	13	26%
Recaída	10	20%
Muerte	4	8%

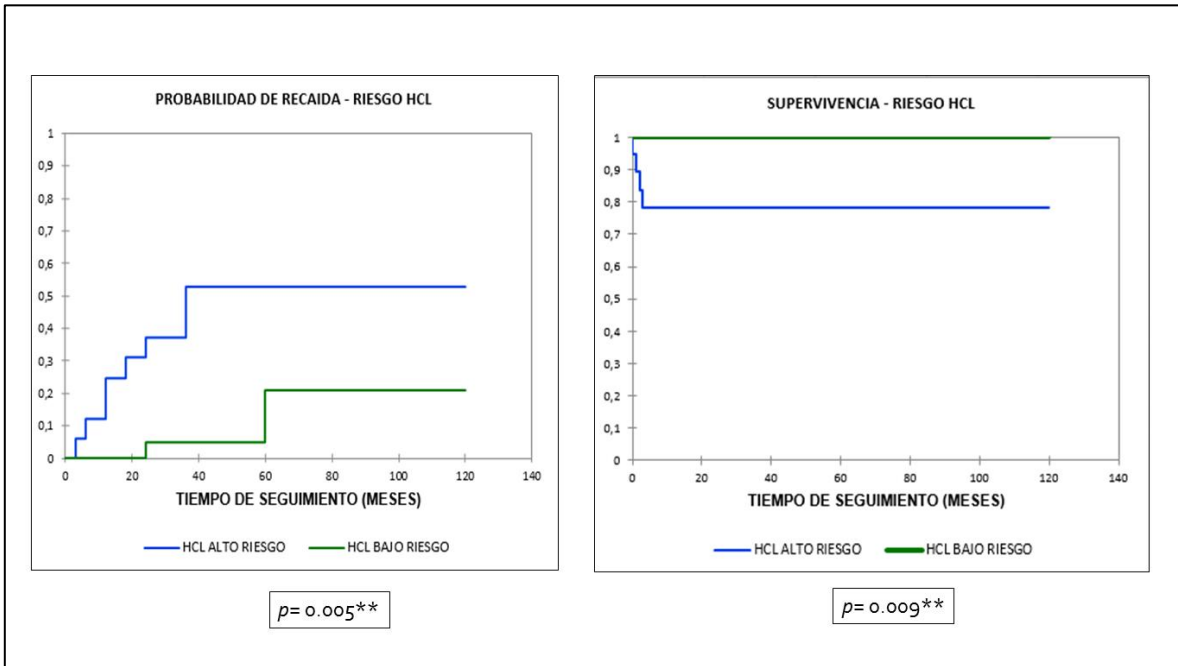


SECUELAS	n: 13	%
Diabetes Insípida	6	46
Deformidad Ósea	4	31
Parálisis Facial	1	8
Neuropatía Crónica	1	8
Desnutrición - Gastrostomía	1	8



Respecto a la evolución clínica de los 50 casos, el 26% de ellos reporto secuelas (n: 13), siendo la más frecuente las endocrinopatías, especialmente la diabetes insípida, pero también se reportaron secuelas de tipo ortopédico por deformidad ósea, neuropatía crónica, parálisis facial y desnutrición. 20% de los casos (n:10) tuvieron recaída de la enfermedad, siendo más frecuentes en el tipo de HCL con compromiso de órgano de riesgo, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tipos de HCL de bajo riesgo (p= 0.005); de igual manera, se registraron 4 fallecimientos como consecuencia de la enfermedad (8%), todos en pacientes con HCL de alto riesgo (p= 0.009), en quienes la enfermedad evoluciono de forma rápida y llevo a la muerte en los primeros meses posteriores al diagnóstico.

Figura 6-2. Kaplan Meier: probabilidad de recaída y supervivencia



Al comparar los tipos de Histiocitosis de células de Langerhans, y simplificando su clasificación en HCL monosistémica, HCL multisistémica sin compromiso de órganos de riesgo y HCL multisistémica con compromiso de órganos de riesgo, se observó que esta última se presentó con mayor frecuencia en pacientes menores de 2 años de edad (85%) al compararlo con pacientes mayores de 2 años de edad (15%) ( $p= 0.004$ ). Asimismo se observó una asociación significativa entre la HCL multisistémica de alto riesgo y la presencia de recaídas ( $p= 0.007$ ) y de muerte ( $p= 0.045$ ). No se encontró asociación significativa entre el tipo de Histiocitosis y otras variables como el sexo y la presencia de secuelas.



Tabla 6-1. Características clínicas y demográficas de pacientes con Histiocitosis de Células de Langerhans

	HCL Mono-sistémica	HCL Multi-sistémica OR-	HCL Multi-sistémica OR+	p
Pacientes: n(%)	24 (48%)	6 (12%)	20 (40%)	
Sexo (M:F)	15:9	3:3	9:11	0,486
Edad media al diagnóstico (m)	67 (12-159)	31 (9-60)	15 (2-36)	
Distribución de la edad: n (%)				
< 2 años	6 (25%)	2 (34%)	17 (85%)	0,004**
> 2 años	18 (75%)	4 (66%)	3 (15%)	
Secuelas	7	3	3	0.624
Recaída	1	1	8	0.007*
Muerte	0	0	4	0.045*

## 6.2 Fase 2: Análisis de la mutación BRAF V600E por estudio de inmunohistoquímica con el anticuerpo ventana VE1:

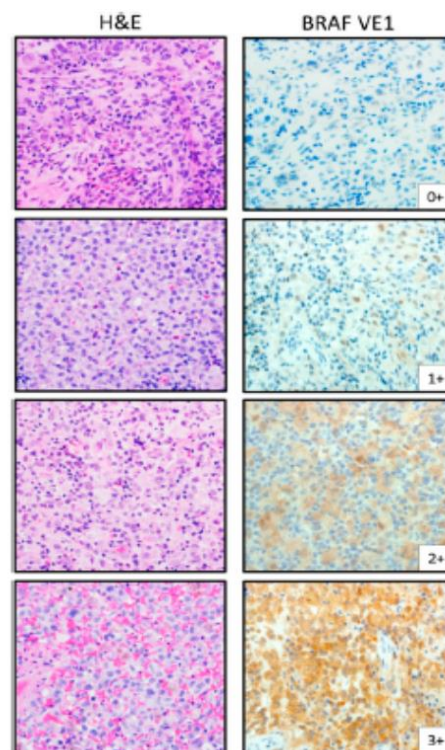
Esta fase se realizó con el marcador de inmunohistoquímica Ventana VE1, para la identificación de la mutación BRAF V600E, en uso conjunto con el Kit Optiview, según los protocolos del fabricante. Este anticuerpo ha sido validado y usado en diferentes patologías como Carcinoma papilar de tiroides, carcinoma colorrectal y melanoma; en Histiocitosis de células de Langerhans se ha demostrado su utilidad y correspondencia con el estado mutacional, siendo el primer reporte el de Roden en 2014, quien mostro una correlación del 95.6% entre las dos técnicas en casos de HCL pulmonar y extrapulmonar; posteriormente otros autores como Mehes observaron correlación del 93%. Para su evaluación es necesaria la tinción fuerte y uniforme del citoplasma, dado que la tinción nuclear se considera inespecífica. Se han planteado diferentes escalas de evaluación de la inmunotinción, siendo la más aceptada la propuesta por Ballester y col. En 2018, una escala semi-cuantitativa de 0 a 3, donde 0 indica la completa ausencia de tinción, 1+

indica una tinción débil apreciable solo a 400X aumentos, 2+ indica una tinción moderada, que es aparente a 100X aumentos y 3+ indica una tinción fuerte e intensa que es aparente a los 40 X aumentos; se considera entonces 0 como una tinción negativa, 1+ como una tinción equívoca, que requiere estudios adicionales, 2+ como positiva, siempre y cuando haya tinción en más del 10% de las células tumorales y 3+ como positiva. En este estudio se realizó una comparación con Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) alelo específica obteniendo la inmunohistoquímica una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100% con el uso de esta escala(22).

Figura 6-3. Inmunohistoquímica para BRAF V600E con Anticuerpo Ventana VE1. Escala de evaluación.

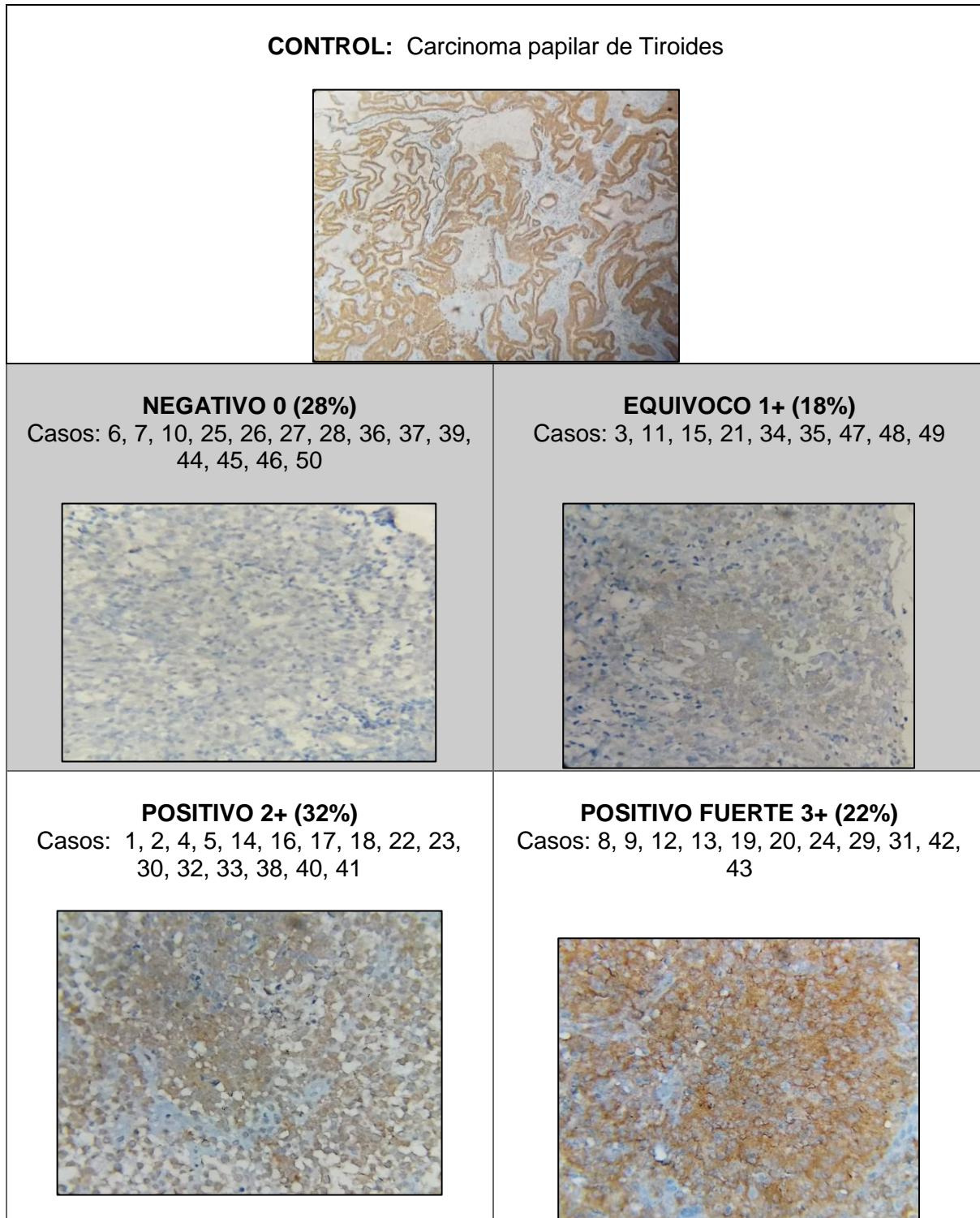
### Escala de intensidad IHQ VENTANA VE1:

0	Ausencia de tinción	NEGATIVA
1+	Tinción débil apreciable solo a 400 x aumentos	EQUÍVOCA. Necesidad de Ensayos moleculares: Gold Standard
2+	Tinción moderada aparente a 100 aumentos con una variabilidad mínima en la intensidad	POSITIVA: > 10% de células
3+	Fuerte tinción aparente a 40 aumentos	Correlación con PCR – alelo específica Sensibilidad de 80% Especificidad de 100%
26 casos evaluados: 3 casos FN: tejido neoplásico <5%/ espécimen decalcificado		



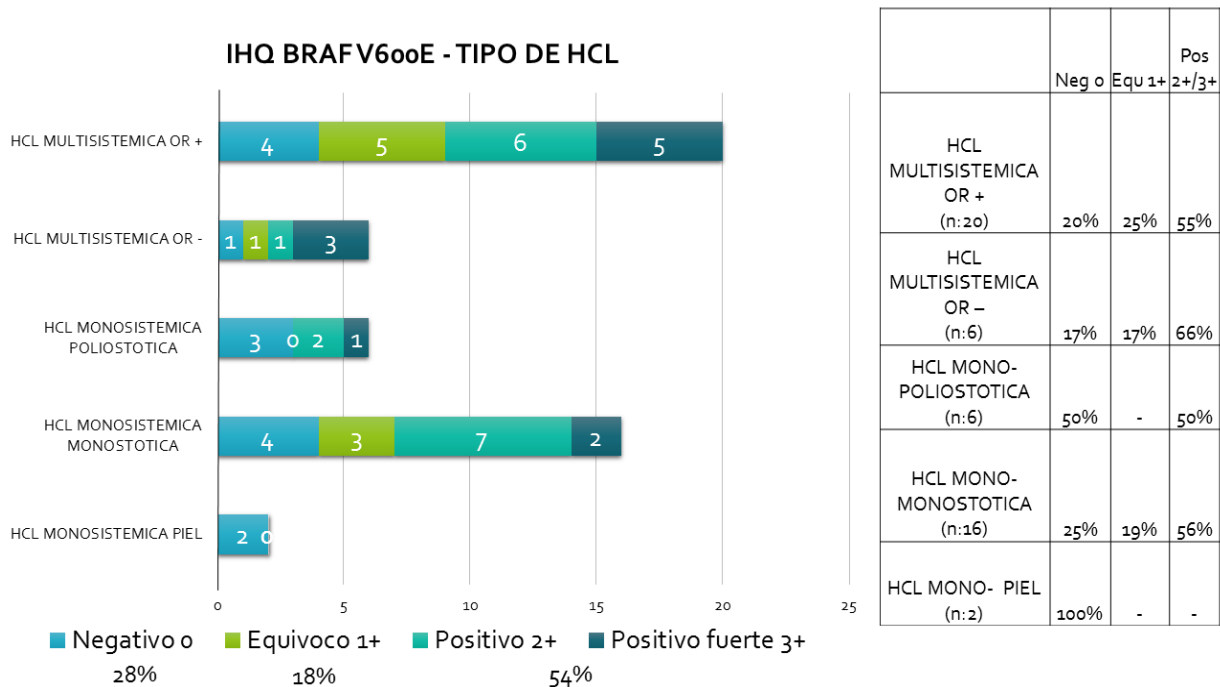
En nuestro estudio usamos esta misma escala semi-cuantitativa para la evaluación de la tinción del anticuerpo Ventana VE1, usando como control positivo un caso de Carcinoma Papilar de Tiroides y obtuvimos los siguientes resultados: la mutación estuvo ausente en el 28% de los casos (n:14) con tinción negativa 0, la mutación era incierta en 18% de los casos (n:9) con tinción equívoca 1+ y la mutación se consideró presente en 54% de los casos con tinciones positiva 2+ (n: 16) y positiva fuerte 3+ (n: 11), dado que todos los casos de tinción 2+ tenían más de 10% de las células positivas.

Figura 6-4. Resultados de evaluación por Inmunohistoquímica para BRAF V600E – Ventana VE1



Cuando se compararon estos resultados según tipo de HCL, se observó que ningún caso de HCL monosistémica con compromiso exclusivo de piel tuvo la mutación; en el resto de tipos de HCL se observó una distribución casi equitativa según los grados de tinción, con mayor presencia de tinción equivocada en los tipos de HCL multisistémica con compromiso de órganos de riesgo y en HCL monosistémica monostótica.

Figura 6-5. Inmunohistoquímica para BRAF V600E con Ventana VE1 y su correlación con tipo de HCL



La única asociación significativamente estadística observada fue la presencia de mutación con el grupo de edad de menores de 2 años ( $p= 0.021$ ), independiente del sexo femenino o masculino ( $p= 0.467$ ), del tipo de Histiocitosis de bajo o alto riesgo ( $p= 0.431$ ), del compromiso monosistémico o multisistémico ( $p= 0.322$ ) y de la evolución clínica con presentación de secuelas ( $p= 0.309$ ), recaídas ( $p= 0.567$ ) o muerte ( $p= 0.146$ ). Sin embargo es necesario anotar que en el grupo de tinción equivocada 1+ se encontraba la mitad del total de pacientes fallecidos ( $n: 2$ ).

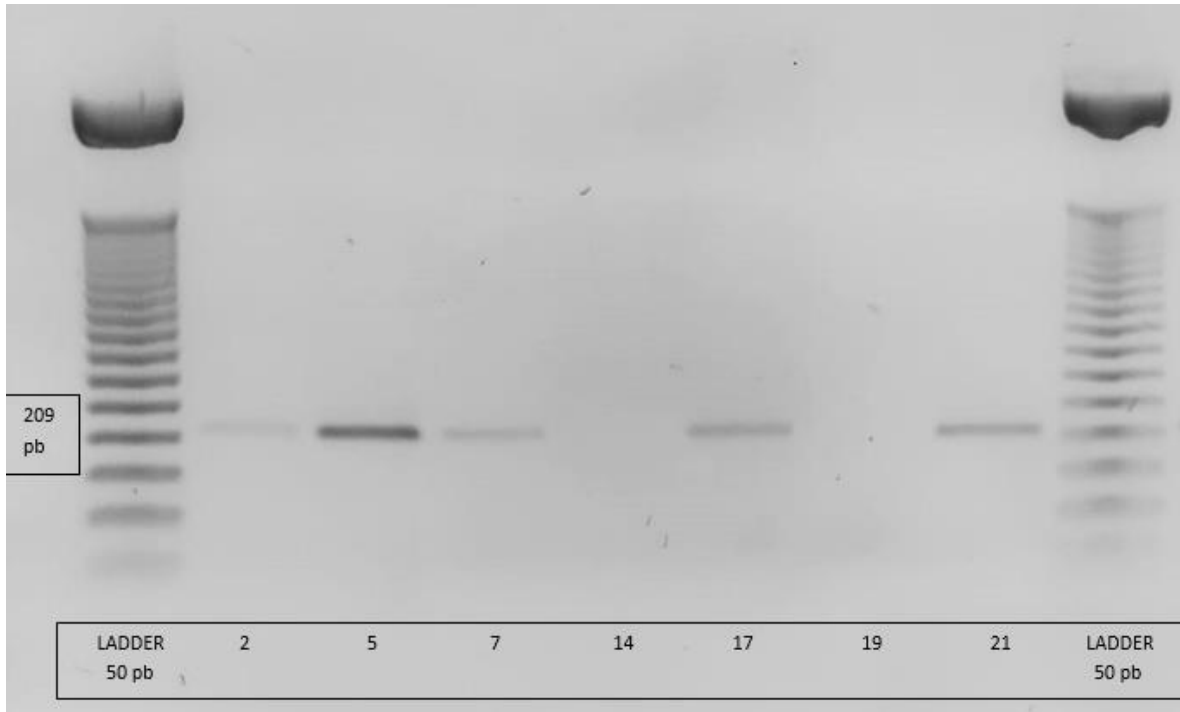
Tabla 6-2. Inmunohistoquímica para BRAF V600E (Ventana VE1) en correlación con características clínicas y demográficas en HCL

CARACTERÍSTICA	Negativo 0 (n:14)	Equívoco 1+ (n:9)	Positivo 2+/3+ (n:27)	p
Sexo				
Femenino	6	6	11	0,467
Masculino	8	3	16	
Edad				
< 2 años	3	7	15	0,021**
> 2 años	11	2	12	
Riesgo HCL				
Bajo Riesgo	10	4	16	0,431
Alto Riesgo	4	5	11	
Compromiso HCL				
Monosistémico	9	3	12	0,322
Multisistémico	5	6	15	
Evolución clínica				
Secuelas	4	4	5	0,309
Recaída	4	2	4	0,567
Muerte	0	2	2	0,146

### 6.3 Fase 3: Estudio molecular de la mutación BRAF V600E por medio de secuenciación de Sanger:

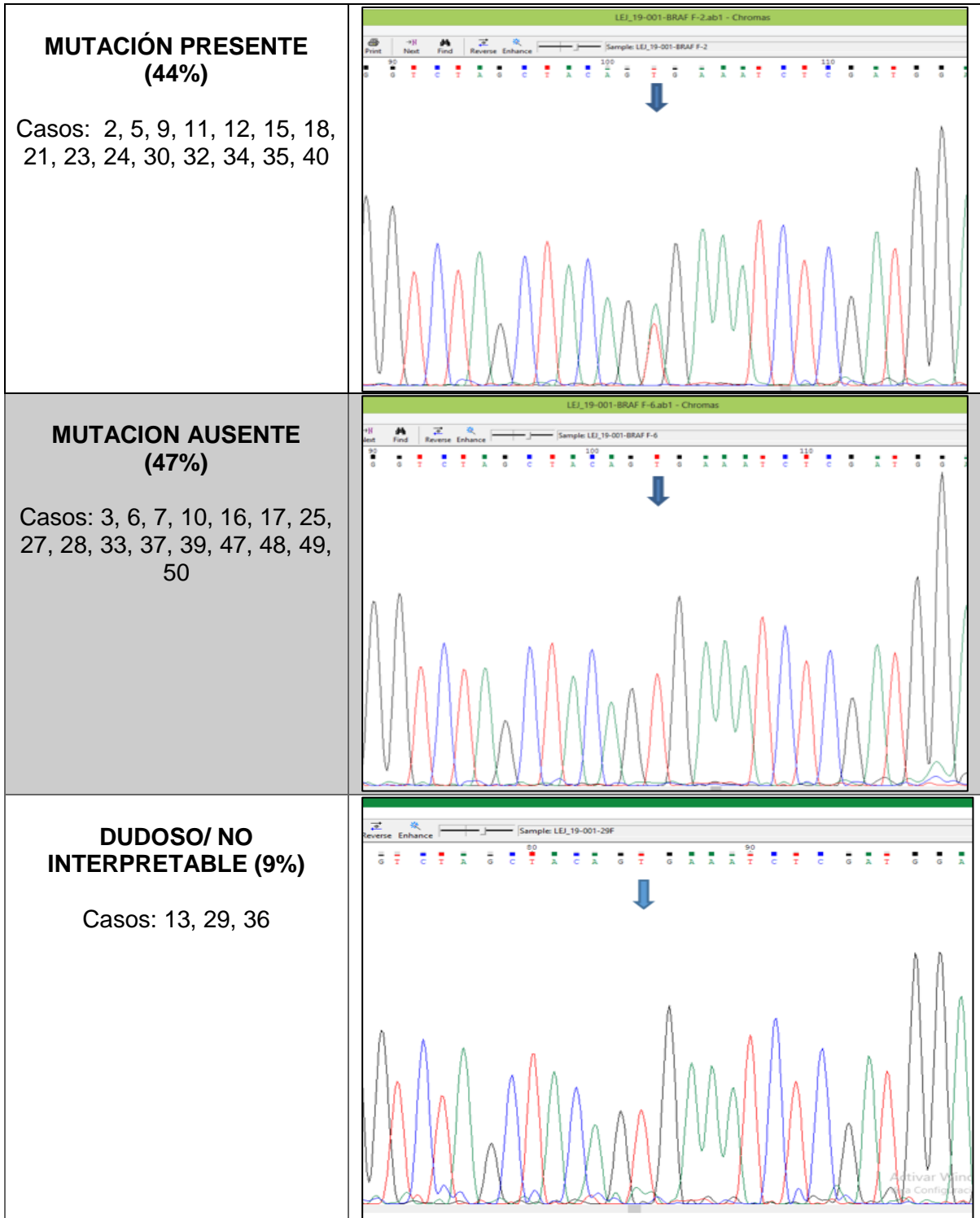
A partir de los bloques de parafina de los 50 casos, se obtuvieron 4 cortes de 10 micras y se prepararon las muestras para el análisis y confirmación molecular, inicialmente con amplificación por medio Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando primers específicos del exón 15 del gen BRAF, y se realizaron corridos en gel de electroforesis para determinar la calidad de las muestras. Fue necesaria la repetición de la reacción en las muestras en la que no se obtuvo visualización del producto por medio de electroforesis; finalmente se obtuvieron 34 muestras y adicionalmente se evaluó la muestra usada como control positivo en el estudio de Inmunohistoquímica (Caso de Carcinoma papilar de tiroides).

Figura 6-6. Productos de amplificación: Gel de electroforesis



Las 34 muestras más el control positivo fueron llevadas a procesos de purificación para la Secuenciación de Sanger, que se llevó a cabo en el Servicio de secuenciación y análisis molecular (SSiGMol), en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional. De las 34 muestras analizadas, 10 habían resultado negativas en el estudio de inmunohistoquímica, 9 tuvieron tinción equivocada 1+, 10 fueron positivas 2+ y 5 tuvieron tinción positiva fuerte 3+. Por medio de la Secuenciación de Sanger se observó que la mutaciones estaba presente en el 44% de las muestras (15 casos), todos ellos heterocigotos; la mutación fue negativa en el 47% de las muestras (16 casos), y el 9% restante correspondió a 3 casos dudosos que no fueron interpretables, debido a la presencia de pequeños picos con un fondo de ruido, a pesar de la repetición de la prueba.

Figura 6-7. Resultados de secuenciación para BRAF V600E



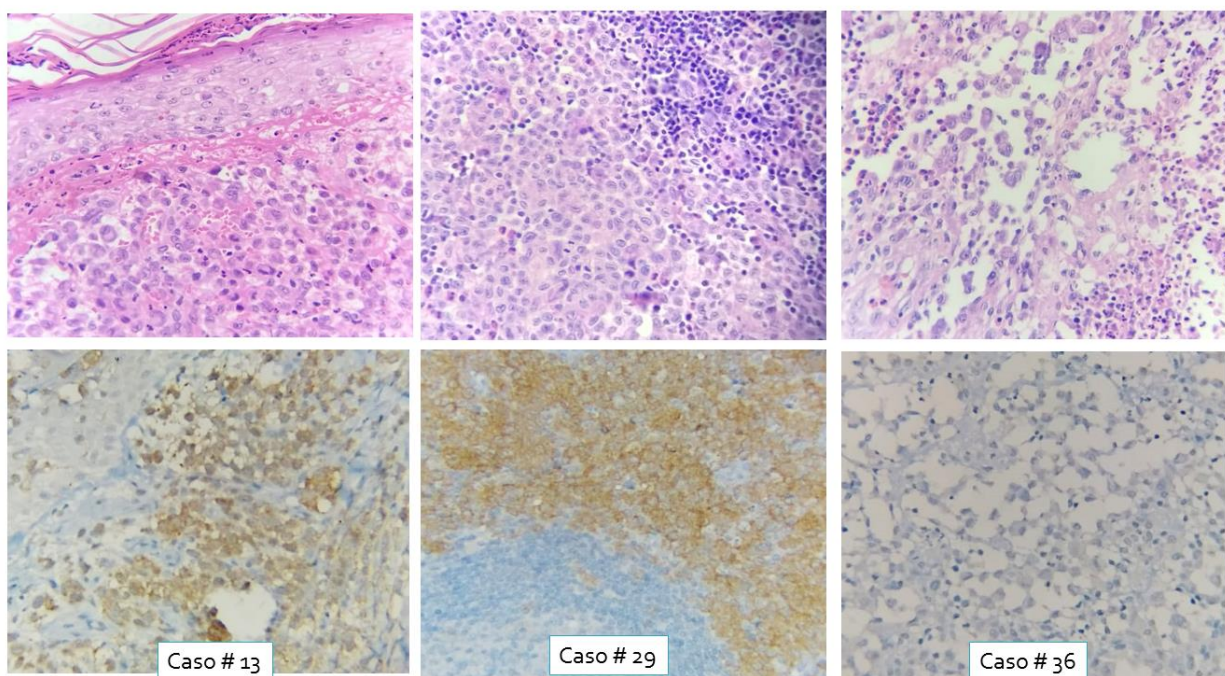


Estos 3 casos correspondieron a muestras de piel, ganglio linfático y hueso, siendo los dos primeros casos positivos 3+ para BRAF V600E por inmunohistoquímica, y el último negativo.

Tabla 6-3. Casos dudosos / no interpretables por secuenciación para BRAF V600E

#	MUESTRA	CLASIFICACION	IHQ	%
13	Piel	HCL Multisistémica OR -	3+	90
29	Ganglio Linfático	HCL Multisistémica OR -	3+	100
36	Hueso	HCL Monosistémica Monostótica	0	-

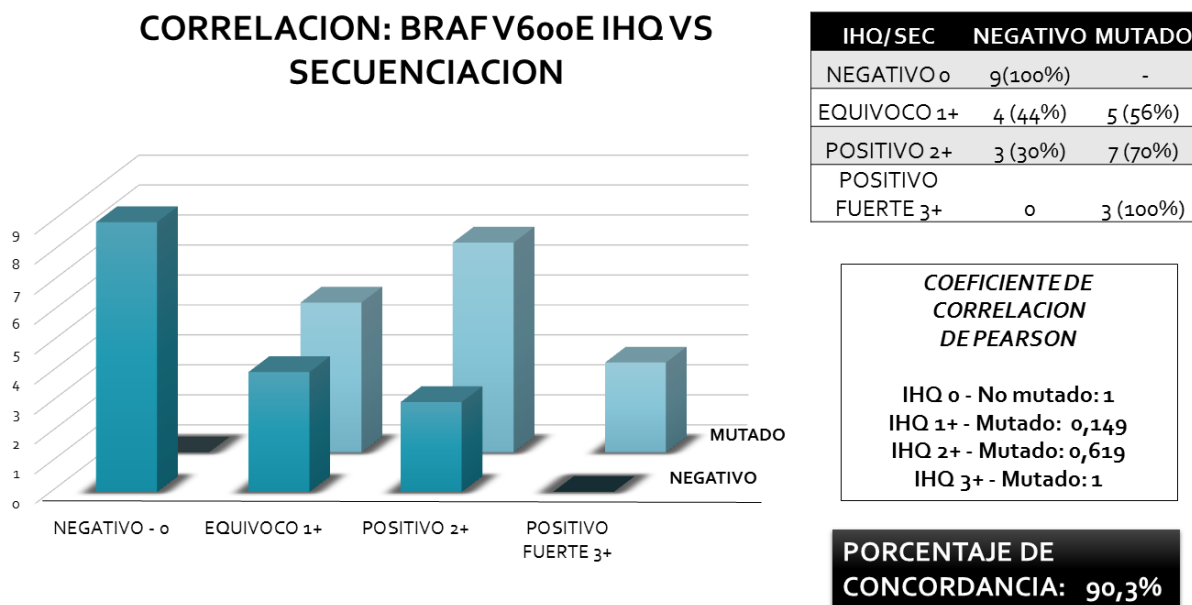
Figura 6-8. Casos dudosos / no interpretables por secuenciación para BRAF V600E



Al analizar resultados mutados y no mutados y contrastarlos con los resultados de cada caso por el estudio de inmunohistoquímica se observó un porcentaje de concordancia del 90.3%



Figura 6-9. Correlación de BRAF V600E por inmunohistoquímica con secuenciación de Sanger

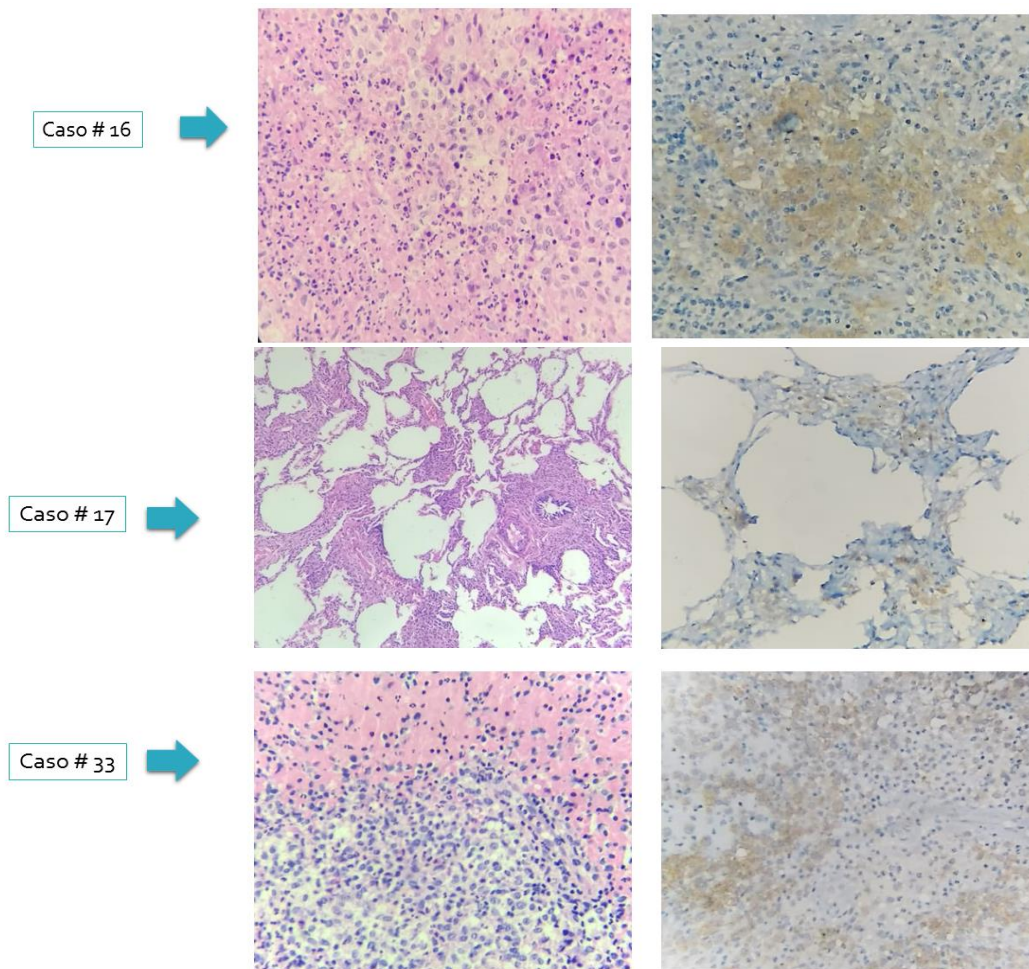


El 100% de los casos negativos con el marcador Ventana VE1, también fueron negativos para la secuenciación; esto mismo sucedió con la inmunotinción fuerte 3+, donde todos los casos fueron positivos por ambas técnicas. En los casos de tinción equivocada 1+, el 44% de los casos (n: 4) resultaron negativos y en el 56% restante (n: 5) se evidenció la mutación por la técnica de secuenciación. De los 10 casos positivos 2+, 3 de ellos resultaron negativos en el estudio de secuenciación, que correspondieron a muestras de bazo, pulmón y hueso, siendo el caso de pulmón el que menor representación de células de Langerhans tenía, con un 20%, y el caso de hueso presentaba extensas zonas de necrosis, lo que podría explicar en parte dichos resultados.

Tabla 6-4. Casos discordantes con inmunohistoquímica 2+ con secuenciación para BRAF V600E negativa

#	MUESTRA	CLASIFICACION	IHQ	%	SECUENCIACION
16	Bazo	HCL Multisistémica OR +	2+	50	Negativo
17	Pulmón	HCL Multisistémica OR +	2+	20	Negativo
33	Hueso	HCL Monosistémica Monostótica	2+	70	Negativo

Figura 6-10. Casos discordantes con inmunohistoquímica 2+ con secuenciación para BRAF V600E negativa



Los casos con tinción equivocada 1+ por inmunohistoquímica, mostraban características demográficas y clínicas heterogéneas: 5 de ellos pertenecían a casos de HCL multisistémica con compromiso de órganos de riesgo y los 4 restantes se distribuyeron en HCL de tipos monosistémica monostótica y multisistémica sin compromiso de órganos de riesgo, con un rango de edad de presentación entre 2 y 50 meses, y tampoco mostraron predilección por tejido de órgano en particular. Como se comentó anteriormente, 2 de los 4 casos que presentaron desenlace fatal estaban en este grupo, y los 2 demostraron tener la mutación al ser analizados con la secuenciación de Sanger.

Tabla 6-5. Casos con tinción equivocada por inmunohistoquímica en correlación con resultados de secuenciación

N° CASO	EDAD (meses)	MUESTRA	CLASIFICACION	SECUELA	RECAIDA	MUERTE	IHQ%	SECUENCIACION
3	36	GANGLIO LINFATICO	HCL MULTISISTEMICA OR +	NO	SI	NO	100%	SILVESTRE
11	24	HUESO	HCL MONOSISTEMICA MONOSTOTICA	NO	NO	NO	30%	MUTADO
15	15	PIEL	HCL MULTISISTEMICA OR +	SI	SI	NO	90%	MUTADO
21	26	PIEL	HCL MULTISISTEMICA OR +	NO	NO	SI	50%	MUTADO
34	2	MEDULA OSEA	HCL MULTISISTEMICA OR +	NO	NO	SI	100%	MUTADO
35	24	HUESO	HCL MONOSISTEMICA MONOSTOTICA	SI	NO	NO	70%	MUTADO
47	60	HUESO	HCL MONOSISTEMICA MONOSTOTICA	NO	NO	NO	60%	SILVESTRE
48	24	PIEL	HCL MULTISISTEMICA OR - : HUESO Y PIEL	SI	NO	NO	70%	SILVESTRE
49	12	PIEL	HCL MULTISISTEMICA OR +	SI	NO	NO	30%	SILVESTRE

**IHQ 1+ (n:9) → Mutación presente en 56%; Mutación Ausente en 44%**

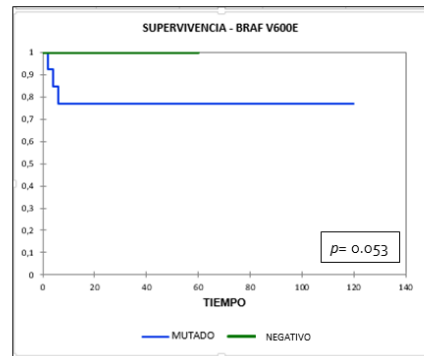
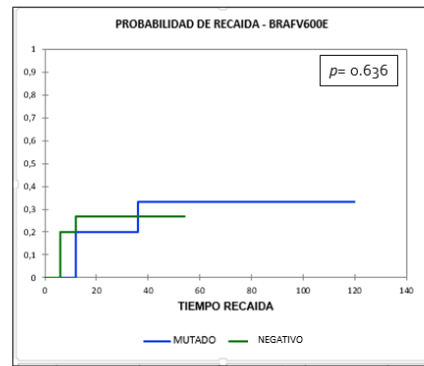
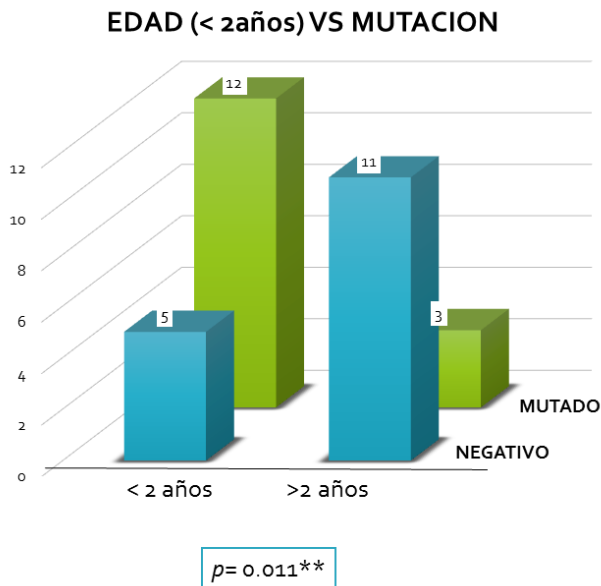
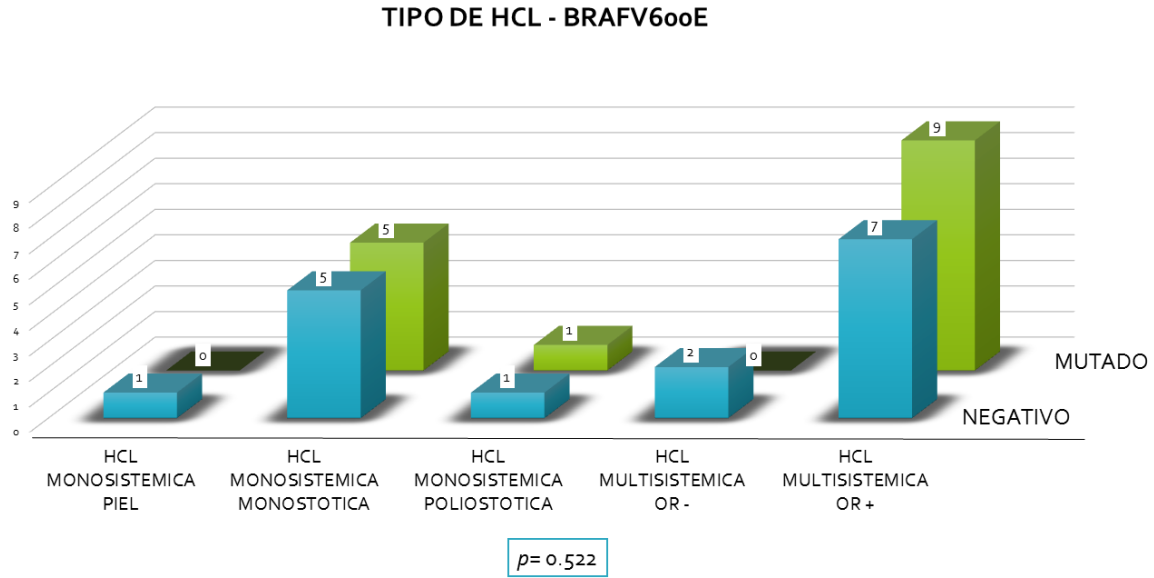
En cuanto a la correlación del estado mutación de BRAF V600E por medio de secuenciación con las características clínicas y demográficas de los pacientes, se observó una asociación estadísticamente significativa con el grupo de edad menor de 2 años ( $p=0.011$ ) y la presencia de la mutación, similar a lo anotado para el estudio de inmunohistoquímica; con otras variables como el sexo, el tipo de histiocitosis (bajo riesgo y alto riesgo), el compromiso mono o multisistémico y la evolución clínica con eventos de secuelas, recaídas y muerte no se encontraron una asociación significativa con el hallazgo de BRAFV600E.

Tabla 6-6. Estado mutacional de BRAF V600E (secuenciación de Sanger) en correlación con características clínicas y demográficas en HCL

CARACTERISTICA	BRAF Normal (n:16)	BRAF Mutado (n:15)	p
Sexo			
Femenino	10	6	0,372
Masculino	6	9	
Edad			
< 2 años	5	12	0,011**
> 2 años	11	3	
Tipo de HCL			
Bajo Riesgo	9	6	0,586
Alto Riesgo	7	9	
Compromiso HCL			
Monosistémico	7	6	1,000
Multisistémico	9	9	
Evolución clínica			
Secuelas	4	3	0,685
Recaída	3	7	1,000
Muerte	0	3	0,101

Al discriminar el tipo de HCL en los 5 grupos se puede observar como hay una distribución pareja en los casos mutados y en los negativos para la mutación, sin tener predilección por un tipo de HCL específica; por otra parte los pacientes menores de 2 años muestran un claro predominio de casos con la mutación, contrario a los pacientes mayores de 2 años

Figura 6-11 A. Tipo de HCL y B. Edad (pacientes menores vs mayores de 2 años) con respecto a la mutación BRAF V600E por secuenciación



## 7. Discusión

En nuestro estudio el tipo de Histiocitosis de células de Langerhans más frecuente correspondió a la HCL multisistémica con compromiso de órganos de riesgo (40% de los casos), esto probablemente debido a que La Fundación HOMI es un centro de referencia de alta complejidad, y la mayoría de casos de HCL de bajo riesgo pudieron ser tratados y observados en otros centros. Las secuelas permanentes más frecuentes fueron de tipo endocrinológico, con Diabetes insípida, y los casos que resultaron fatales tuvieron una rápida progresión clínica con pobre respuesta al manejo inicial instaurado; estos datos coinciden con lo reportado en la literatura. En la fase inicial la serie de casos mostró una asociación estadísticamente significativa entre tipo de Histiocitosis de células de Langerhans de alto riesgo con: edad de presentación: pacientes menores de 2 años de edad ( $p=0.004$ ); con mayor riesgo de recaída ( $p=0.007$ ) y peor sobrevida ( $p=0.045$ ), al ser comparada tanto con Histiocitosis de células de Langerhans de los otros tipos con compromiso monosistémico, como multisistémico de bajo riesgo.

El estudio de inmunohistoquímica con el marcador Ventana VE1, no mostro dificultades para su realización y evaluación; esta técnica demostró positividad para la mutación BRAF V600E en un 54% de los casos, y de las 50 muestras, 34 fueron llevadas a análisis molecular por Secuenciación, encontrando un porcentaje de concordancia de 90,3% entre los dos métodos utilizados para evaluar la mutación.

Se observaron discrepancias en 3 de las 34 muestras, que mostraron positividad para BRAF V600E por inmunohistoquímica y fueron negativas por secuenciación. Haciendo revisión de la literatura se considera más posible que se traten de falsos negativos de la secuenciación, que pudieron estar relacionados con la pobre representación de la lesión en los tejidos, en la fase pre-analítica, como consecuencia del desgaste de los bloques de parafina que requirieron múltiples cortes como parte de su estudio diagnóstico inicial.

De 9 muestras consideradas equivocadas para BRAFV600E por Inmunohistoquímica con tinción calificada como 1+, el 56% fue positivo por secuenciación, y 44% fue negativo; esto plantea la necesidad de confirmación con un método molecular, con mayor sensibilidad, dado que la inmunotinción débil y focal no es suficiente para establecer la

presencia de la mutación BRAF V600E. La aproximación con Ventana VE1 para BRAF V600E es útil en los casos con positividad o negatividad evidentes.

Tanto en el estudio de Inmunohistoquímica como en el de secuenciación, se encontró una diferencia estadísticamente significativa de BRAF V600E con la edad de presentación (pacientes menores de 2 años vs pacientes mayores de 2 años) ( $p= 0,021$  y  $p=0.011$  respectivamente); esto en correlación con estudios previos reportados en la literatura, donde esta era la asociación más fuerte relacionada con la mutación; a pesar que la Histiocitosis de células de Langerhans de alto riesgo es más frecuente en este grupo de edad, este tipo de histiocitosis no tuvo relación estadísticamente significativa con la presencia de la mutación.

El hallazgo de la mutación BRAF V600E por las dos técnicas utilizadas no tuvo diferencias estadísticamente significativas con presencia de secuelas, riesgo de recaída o mortalidad, a diferencia de otros estudios reportados en la literatura; a pesar de no haber una relación directa entre la presencia de la mutación y el tipo de Histiocitosis, si se observó que todos los casos de compromiso exclusivo cutáneo, que tuvieron buen pronóstico fueron negativos para BRAF V600E por los dos métodos utilizados en este estudio.

Dado el planteamiento de los posibles falsos negativos por la secuenciación de Sanger, consideramos que sería ideal analizar la totalidad de las muestras con una prueba molecular de mayor sensibilidad, como PCR en tiempo real y PCR digital, con énfasis en los resultados equívocos 1+ por inmunohistoquímica, y comprobar la negatividad y/o positividad para BRAF V600E, lo que abre la puerta a la realización de nuevos proyectos que despejen estos interrogantes.

## 8. Conclusiones

La Histiocitosis de células de Langerhans es una enfermedad infrecuente, de naturaleza heterogénea, que se presenta con mayor frecuencia en la población pediátrica, y en los pacientes menores de dos años tiende a tener un peor pronóstico asociado a HCL de alto riesgo, con un mayor riesgo recaída y peor sobrevida. Además, esta edad de presentación de la enfermedad tiene asociación significativa con la presencia de la mutación somática BRAF V600E, que en general se reportó en el 54% de los casos.

El estudio de inmunohistoquímica con el marcador Ventana VE1 mostró un buen rendimiento diagnóstico con concordancia de 90.5% con respecto a la secuenciación directa de Sanger, pero es necesario hacer una graduación de la intensidad de su tinción, dado que los casos con tinción débil y focal 1+ pueden representar falsos positivos; entonces la aproximación con Ventana VE1 para BRAF V600E es útil en los casos con positividad o negatividad evidentes; de otra forma se requiere el uso de métodos moleculares de mayor sensibilidad para la confirmación.

Es necesario asegurar que la prueba molecular se realice sobre el mismo segmento de tejido donde se hace la inmunohistoquímica, para evitar confusiones en la interpretación de los resultados.



## 9.Consideraciones éticas

- De acuerdo con los principios establecidos en Declaración de Helsinki, Reporte Belmont, Pautas CIOMS y en la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, y en cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 6 de dicha Resolución, este estudio se desarrolló conforme a los siguientes criterios:
- Esta investigación está considerada como “Investigación sin riesgo” de acuerdo al Artículo 10 de la Resolución 008430/93, al emplear técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y dado que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio.
- La investigación se llevó a cabo una vez se obtuvieron las respectivas autorizaciones de la institución investigadora y de la institución donde se realizara la investigación y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación de la institución.
- El proyecto reconoce que las personas tienen derecho a la privacidad y al anonimato. Se tomaron toda clase de precauciones para proteger la confidencialidad de la información y la identidad de los participantes, realizando la recolección y el análisis de datos dentro de la institución, sin uso de esta información por fuera de la misma.
- La investigación se realizó de manera que reduzca al mínimo el posible daño al medio ambiente.

## 10. Referencias bibliográficas

1. Grana N. Langerhans Cell Histiocytosis. *Cancer Control*. 2014;21(4):328-34.
2. Haupt R, Minkov M, Astigarraga I, Schäfer E, Nanduri V, Jubran R, et al. Langerhans cell histiocytosis (LCH): Guidelines for diagnosis, clinical work-up, and treatment for patients till the age of 18 years. *Pediatric blood & cancer*. 2013;60(2):175-84.
3. El Demellawy D, Young JL, de Nanassy J, Chernetsova E, Nasr A. Langerhans cell histiocytosis: a comprehensive review. *Pathology-Journal of the RCPA*. 2015;47(4):294-301.
4. Berres M-L, Lim KPH, Peters T, Price J, Takizawa H, Salmon H, et al. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(4):669-83.
5. Monsereenusorn C, Rodriguez-Galindo C. Clinical Characteristics and Treatment of Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2015.
6. Gómez A, Lotero V, Martínez P, Medina D, Ramírez O. Histiocitosis de células de Langerhans en niños. Descripción de 10 casos. *CES Medicina*. 2013;27(2):177-84.
7. Ribeiro KB, Degar B, Antoneli CBG, Rollins B, Rodriguez-Galindo C. Ethnicity, race, and socioeconomic status influence incidence of langerhans cell histiocytosis. *Pediatric blood & cancer*. 2015.
8. Venkatramani R, Rosenberg S, Indramohan G, Jeng M, Jubran R. An exploratory epidemiological study of Langerhans cell histiocytosis. *Pediatric blood & cancer*. 2012;59(7):1324-6.
9. Willman CL, Busque L, Griffith BB, Favara BE, McClain KL, Duncan MH, et al. Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X)--a clonal proliferative disease. *New England Journal of Medicine*. 1994;331(3):154-60.
10. Yu R, Chu A, Chu C, Buluwela L. Clonal proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *The Lancet*. 1994;343(8900):767-8.
11. Rizzo FM, Cives M, Simone V, Silvestris F. New insights into the molecular pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *The oncologist*. 2014;19(2):151-63.
12. Allen CE, Li L, Peters TL, Leung H-cE, Yu A, Man T-K, et al. Cell-specific gene expression in Langerhans cell histiocytosis lesions reveals a distinct profile compared with epidermal Langerhans cells. *The Journal of Immunology*. 2010;184(8):4557-67.

13. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, Rodriguez-Galindo C, Rollins BJ. Recent advances in the understanding of Langerhans cell histiocytosis. *British journal of haematology*. 2012;156(2):163-72.
14. Harmon CM, Brown N. Langerhans Cell Histiocytosis: A Clinicopathologic Review and Molecular Pathogenetic Update. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2015;139(10):1211-4.
15. Minkov M, Grois N, McClain K, Nanduri V, Rodriguez-Galindo C, Simonitsch-Klupp I. Histiocyte Society evaluation and treatment guidelines, April 2009. 2013.
16. Satoh T, Smith A, Sarde A, Lu H-c, Mian S, Trouillet C, et al. B-RAF mutant alleles associated with Langerhans cell histiocytosis, a granulomatous pediatric disease. *PLoS One*. 2012;7(4):e33891.
17. Nichols KE, Arceci RJ. BRAF, a piece of the LCH puzzle. *Blood*. 2010;116(11):1825-7.
18. Nann D, Schneckenburger P, Steinhilber J, Metzler G, Beschorner R, Schwarze C, et al. Pediatric Langerhans cell histiocytosis: the impact of mutational profile on clinical progression and late sequelae. *Annals of hematology*. 2019:1-10.
19. Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünwald I, Schlaak M, Kreuzberg N, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p. V600E and non-p. V600E BRAF mutations. *BMC cancer*. 2014;14(1):13.
20. Roden AC, Hu X, Kip S, Castellar ERP, Rumilla KM, Vrana JA, et al. BRAF V600E expression in Langerhans cell histiocytosis: clinical and immunohistochemical study on 25 pulmonary and 54 extrapulmonary cases. *The American journal of surgical pathology*. 2014;38(4):548-51.
21. Méhes G, Irsai G, Bedekovics J, Beke L, Fazakas F, Rózsa T, et al. Activating BRAF V600E mutation in aggressive pediatric Langerhans cell histiocytosis: demonstration by allele-specific PCR/direct sequencing and immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology*. 2014;38(12):1644-8.
22. Ballester LY, Cantu MD, Lim KP, Sarabia SF, Ferguson LS, Renee Webb C, et al. The use of BRAF V600E mutation-specific immunohistochemistry in pediatric Langerhans cell histiocytosis. *Hematological oncology*. 2018;36(1):307-15.
23. Bubolz A-M, Weissinger SE, Stenzinger A, Arndt A, Steinestel K, Brüderlein S, et al. Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations. *Oncotarget*. 2014;5(12):4060.

24. Héritier S, Emile J-F, Barkaoui M-A, Thomas C, Fraitag S, Boudjemaa S, et al. BRAF mutation correlates with high-risk Langerhans cell histiocytosis and increased resistance to first-line therapy. *Journal of clinical oncology*. 2016;34(25):3023.
25. Héritier S, Hélias-Rodzewicz Z, Lapillonne H, Terrones N, Garrigou S, Normand C, et al. Circulating cell-free BRAFV600E as a biomarker in children with Langerhans cell histiocytosis. *British journal of haematology*. 2017;178(3):457-67.
26. Selway JL, Harikumar PE, Chu A, Langlands K. Genetic homogeneity of adult Langerhans cell histiocytosis lesions: Insights from BRAFV600E mutations in adult populations. *Oncology letters*. 2017;14(4):4449-54.
27. Zeng K, Wang Z, Ohshima K, Liu Y, Zhang W, Wang L, et al. BRAF V600E mutation correlates with suppressive tumor immune microenvironment and reduced disease-free survival in Langerhans cell histiocytosis. *Oncoimmunology*. 2016;5(7):e1185582.
28. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile J-F, Arnaud L, Maksud P, Charlotte F, et al. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2013;121(9):1495-500.
29. Brown NA, Furtado LV, Betz BL, Kiel MJ, Weigelin HC, Lim MS, et al. High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E negative Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2014:blood-2014-05-577361.
30. Chakraborty R, Hampton OA, Shen X, Simko SJ, Shih A, Abhyankar H, et al. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis. *Blood*. 2014;124(19):3007.