

Novedades en biología molecular y su aplicación en el diagnóstico y el tratamiento del melanoma

A. Martorell-Calatayud^a, C. Requena^a, R. Botella-Estrada^a y O.P. Sangüeza^{b,c}

^aDepartamento de Dermatología. Instituto Valenciano de Oncología. Valencia. España.

^bDepartamento de Patología. ^cDepartamento de Dermatología. Wake Forest University School of Medicine. Winston-Salem. North Carolina. Estados Unidos de Norteamérica.

Resumen. El melanoma (MM) es la primera causa de muerte por cáncer cutáneo, pese a que sólo representa un 4% dentro del conjunto de las neoplasias cutáneas.

El mecanismo patogénico implicado en el desarrollo del melanoma no se conoce bien en la actualidad. Sin embargo, es indudable la existencia de una interacción de factores ambientales y genéticos.

El desarrollo de la biología molecular en el campo de la Medicina ha mostrado un crecimiento exponencial en los últimos años. En el área de la Dermatología su aplicación al estudio del MM ha supuesto importantes avances en cuanto al conocimiento de las principales vías moleculares implicadas en su desarrollo. Estos hallazgos no sólo permiten un mejor conocimiento en cuanto a la patogenia de la enfermedad, sino que además tienen una utilidad práctica. Por una parte, la caracterización molecular del MM puede ser de gran ayuda en el diagnóstico diferencial entre lesiones melanocíticas benignas y malignas, en las que los criterios histopatológicos resultan insuficientes, como ocurre en el caso del nevus de Spitz y del melanoma spitzoide. Por otro lado, el conocimiento de las vías moleculares alteradas en las diversas lesiones melanocíticas malignas establece nuevas dianas terapéuticas en el manejo de los melanomas con diseminación a distancia, en los que el tratamiento quimioterápico utilizado en la actualidad ha fracasado en su objetivo de alargar la esperanza de vida.

Actualmente el empleo de estas técnicas en el campo dermatológico tiene principalmente la limitación de la disponibilidad, ya que su uso en muchos casos se restringe a trabajos de investigación, de manera que no están accesibles en la mayoría de los hospitales. Sin embargo, este problema probablemente se solventará en el momento en el que se estandaricen los patrones moleculares que permitan establecer una caracterización pronóstica y terapéutica de esta importante entidad.

Palabras clave: melanoma, cáncer cutáneo, biología molecular, pronóstico, tratamiento, fisiopatología.

ADVANCES IN MOLECULAR BIOLOGY AND THEIR APPLICATION IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MELANOMA

Abstract. Even though malignant melanoma accounts for 4% of all skin cancers, it is the type responsible for most deaths.

The pathogenesis of melanoma is currently not well understood, although an interaction of environmental and genetic factors doubtlessly plays a role.

Molecular biology in medicine has progressed increasingly rapidly in recent years. In dermatology, application of molecular biology techniques to the study of malignant melanoma has led to important advances in our knowledge of the main molecular pathways implicated in its development. These findings not only can improve our knowledge of the pathogenesis of the disease but may also have practical implications. Thus, molecular characterization of malignant melanoma may be of great help in differentiating between benign and malignant melanocytic lesions when histopathological features prove insufficient as is the case, for example, in Spitz nevus and spitzoid melanoma. In addition, knowledge of the abnormal molecular pathways in different malignant melanoma lesions can point to new therapeutic targets for treating patients with melanomas with distant metastases, in whom current chemotherapy has failed to extend life expectancy.

At present, lack of availability is the main barrier to use of these techniques in dermatology—they are often limited to research, so not generally available in most hospitals. This problem will, however, be overcome when the molecular patterns become standardized, allowing a prognostic and therapeutic characterization of this important disease.

Key words: melanoma, skin cancer, molecular biology, prognosis, treatment, pathophysiology.

Correspondencia:
Omar P. Sangüeza.
Department of Pathology.
Wake Forest University School of Medicine.
Medical Center Boulevard.
Winston Salem NC 37104-1072.
osanguiez@wfubmc.edu

Introducción: principales vías moleculares en la patogénesis del melanoma

Las alteraciones genéticas en el melanoma (MM) aparecen como combinaciones particulares de lesiones que interrumpen un preciso grupo de vías moleculares, cada una de las cuales presenta un papel crucial en el desarrollo de esta proliferación neoplásica maligna (fig. 1).

El modelo histopatológico de Clark describe los cambios histológicos que acompañan a la progresión de una lesión melanocítica desde una lesión benigna hasta el desarrollo de un MM¹. En el presente apartado se correlacionarán los cambios histológicos secuenciales en la evolución hasta la lesión melanocítica maligna con sus mutaciones genéticas particulares, estableciendo cómo estas alteraciones moleculares contribuyen al desarrollo de este proceso.

Primera fase: la formación de la lesión melanocítica

Según el modelo de Clark¹ el primer fenómeno en el inicio de una lesión melanocítica es el desarrollo del nevus melanocítico, compuesto por melanocitos sin atipia citológica con tendencia a organizarse en nidos celulares. La evolución benigna de esta lesión melanocítica viene determinada por un crecimiento celular limitado, de forma que un nevus melanocítico raramente progresa a MM. La ausencia de progresión de esta proliferación celular viene probablemente determinada por un mecanismo de senescencia celular regulado genéticamente.

Desde el punto de vista molecular la proliferación névica viene determinada por la activación de la MAPK (*mito-*

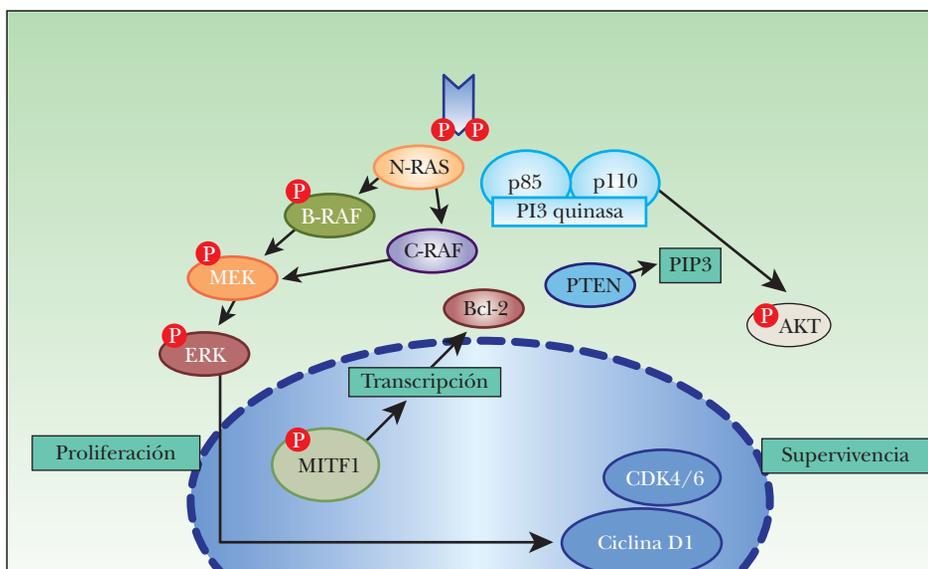
gen-activated protein kinase), también denominada ERK 1/2 (*Extracellular signal regulated kinase*). Se trata de una compleja vía que actúa a modo de mediador intracelular en la transmisión de la información procedente de un receptor tirosín-quinasa extracelular a un efector intracelular, que en este caso genera la proliferación y crecimiento celular de los melanocitos. Clásicamente considerada primariamente mitogénica, la activación de la vía de la MAPK también regula la diferenciación, la senescencia y la supervivencia celular no solamente del MM, sino de una amplia variedad de cánceres no cutáneos^{2,3}. La activación patológica de esta vía de proliferación melanocítica se debe principalmente al desarrollo de una mutación activadora de BRAF, o en menor medida de N-RAS. Ambas mutaciones son excluyentes entre sí en cuanto a su aparición, de forma que la presencia de mutación en el BRAF va acompañada de ausencia de mutación en la familia RAS y viceversa.

El hecho de que estas mutaciones parecen ser el origen del proceso proliferativo melanocítico, unido a que la eliminación *in vitro* de estas dos proteínas (B-RAF, N-RAS) inhiben el crecimiento del MM^{4,5} ha hecho que actualmente se considere el bloqueo de estas como una de las posibles dianas moleculares terapéuticas del futuro⁶ (ver el apartado de «Terapia génica»).

Mutación del gen BRAF

La mutación en BRAF, principalmente una sustitución fosfomimética en el dominio de activación de la quinasa, V600E, es la mutación somática más prevalente en el MM, con una prevalencia que oscila entre el 27 y el 70% de los casos⁶⁻¹², confiriendo una activación constitutiva¹³⁻¹⁵. La distribución con la que aparece esta mutación en función del tipo de fotoexposición solar (ver en el

Figura 1. Vías de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) y de la PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa).



apartado «La biología molecular como base de una nueva clasificación del melanoma») sugiere una posible relación etiológica con los rayos ultravioleta (UV). Esta alteración, que ha sido detectada en una gran variedad de neoplasias, también aparece en lesiones melanocíticas benignas, de forma que entre el 73 y 82% de los nevos comunes y entre el 52 y 80% de los nevos atípicos presentan esta mutación⁶⁻¹². Este hecho establece que, si bien la mutación activadora del gen BRAF es la alteración inicial más frecuente en el inicio del desarrollo de proliferaciones melanocíticas, no es en absoluto suficiente para inducir un MM. De esta forma su evolución hacia el desarrollo de la neoplasia melanocítica maligna dependerá de la existencia de otras mutaciones asociadas. La proteína mutante B-RAF^{V600E} va acompañada de senescencia celular, principalmente mediante la inducción concomitante del INK4a (quinasa 4 inhibidora del ciclo celular) y de SA-B-Gal (B-galactosidasa ácida asociada con senescencia). La mutación asociada de ésta o de otra vía de senescencia celular todavía no conocida sería una posible causa del desarrollo de MM⁶⁻¹².

Mutación en la familia RAS

En contraste con otros tumores sólidos las mutaciones de la familia del gen RAS son poco frecuentes en el MM, de modo que se detectan sólo en el 10-15% de los casos. El MM nodular amelanótico supone la variante de MM que muestra mutaciones de este gen con mayor frecuencia¹⁶. N-RAS es el subtipo de la familia RAS que más habitualmente se encuentra mutado en los procesos melanocíticos. La mutación activadora de este gen aparece en el 56% de los nevos congénitos, en el 33% de los MM primarios y hasta en el 26% de los MM metastásicos¹⁷. Su activación se ha correlacionado con los MM nodulares y con la fotoexposición^{18,19}. La activación de H-RAS ha sido detectada excepcionalmente en el MM, sin embargo se pueden encontrar aproximadamente en un 10% de los nevos de Spitz (ver el apartado «La biología molecular en la diferenciación de lesiones melanocíticas complicadas: nevos de Spitz frente a melanoma spitzoide»). La activación de la proteína H-RAS en el nevus de Spitz se debe bien a ganancias en el brazo corto del cromosoma 11 (donde se localiza el gen del H-RAS), bien a mutaciones en el *locus* del H-RAS²⁰. Mutaciones activadoras en K-RAS no han sido descritas en el desarrollo de lesiones melanocíticas. La presencia de una u otra mutación activadora supone distintos comportamientos biológicos de las lesiones pigmentadas. Así, la existencia de la mutación activadora en H-RAS, asociada a mutaciones inactivadoras de INK4a, ARF (*alternative reading frame*) y/o p53 se asocian al desarrollo de MM no metastásicos^{21,22}. Por el contrario, la mutación en N-RAS con deficiencia en INK4a/Arf se asocia con MM cutáneos con elevada capacidad invasiva y corta latencia,

correspondiéndose clínicamente al MM nodular, con gran capacidad de diseminación a distancia²³.

Segunda fase: desarrollo de atipia citológica e inactivación de genes supresores tumorales

El siguiente paso en la evolución del MM según el modelo de Clark es el desarrollo de atipia citológica, que resulta desde el punto de vista clínico en un nevus displásico. Esta lesión surge *de novo* en un 85% de los casos, mientras que hasta el 15% surge de un nevus melanocítico juntural previamente establecido.

Las alteraciones moleculares en este estadio incluyen las que cursan con disregulación de la velocidad de crecimiento, con alteración en la reparación del ADN y con la pérdida de la capacidad de apoptosis celular.

Entre un 25 y un 40% de los casos de MM familiar presentan una alteración característica²⁴, que consiste en una mutación en la línea germinal que inactiva al CDKN2A, gen simple que codifica dos proteínas supresoras tumorales, p16 INK4A y p14 ARF (proteína resultante de la lectura en dirección opuesta de los exones compartidos con INK4A; p19 ARF en ratones)^{25,26}. Este gen de forma aislada incrementa la probabilidad de desarrollar MM a partir de nevos displásicos o *de novo*.

Entre el 25 y el 50% de los casos de MM esporádico^{27,28} presenta mutación en otro gen supresor tumoral, conocido como PTEN (*phosphatase and tensin homologue*)^{29,30}.

La aparición de ambas mutaciones de forma aislada no genera el desarrollo de MM, ya que existen vías alternativas todavía hoy no conocidas que compensan dichos déficits³¹. La afectación combinada de ambas mutaciones o de una de ellas con mutaciones en otros genes conducen al desarrollo de MM.

CDKN2A, locus del melanoma familiar

Las características físicas como el fototipo, la mayor o menor capacidad para adquirir el bronceado, el pelo rojo y los ojos azules se correlacionan con el aumento de riesgo de desarrollo de MM³². Sin embargo, uno de los factores de riesgo más significativo para el desarrollo de MM es la existencia de antecedentes familiares del mismo. Recientes metaanálisis que estudian estos grupos observaron que la presencia de al menos un familiar de primera línea con MM incrementa el riesgo de desarrollarlo en hasta 2,24 veces^{33,34}. Estudios genéticos dirigidos a explicar este fenómeno llevaron a la identificación del CDKN2A como principal gen implicado en el MM familiar. Se localiza en la región del cromosoma 9p21; su pérdida de heterocigosidad o su mutación en la línea germinal han sido descritas en el 40% de casos de MM familiar. Por otra parte, la existen-

cia de deleciones centradas en este gen han sido detectadas en otros tipos de cánceres, lo que origina la relativa frecuencia de asociación de procesos oncológicos no melanocíticos, tales como el cáncer de páncreas en este grupo poblacional³⁵.

El CDKN2A codifica dos proteínas distintas que actúan en la regulación del crecimiento celular. Estas incluyen la INK4A y la ARF mediante la utilización de promotores alternantes sobre los primeros exones del cromosoma 9p21 (1 para INK4A, 1 para ARF)³⁶. Ambas proteínas son codificadas a partir de la misma región cromosómica, pero son traducidas en patrones de lectura opuestos.

La INK4A (conocida como P16^{INK4A}) pertenece a la vía de regulación molecular INK4A-CDK4/6/ciclina D1 (CCND1)-RB (retinoblastoma). La inactivación aislada (con funcionalidad normal de ARF) de esta proteína, secundaria a una mutación de la línea germinal en CDKN2a, ha sido identificada en hasta el 40% de los MM familiares y en el 0,2-2% de los MM esporádicos^{37,38}. Actúa sobre el punto de partida G1-S en el ciclo celular como supresor tumoral inhibiendo la quinasa dependiente de ciclina D1 (CDK4/6/ciclina D1, CCND1)³⁹. Esta última tiene la función de inactivar la proteína de retinoblastoma (RB), reguladora del ciclo celular, mediante la fosforilación de la misma. La pérdida de función de INK4A generaría que la CDK4/6/ciclina D1 produjera una inactivación de RB por hiperfosforilación, y como consecuencia de ello una disregulación del ciclo celular. Sin embargo, el desarrollo de MM en pacientes con esta mutación requeriría de la presencia de otras alteraciones moleculares, tales como N-RAS, que actuaría como activadora de la MAPK.

La ARF (proteína resultante de la lectura en dirección opuesta de los exones compartidos con INK4A, conocida como p14ARF en humanos, p19ARF en ratones), pertenece a la vía de regulación molecular ARF-MDM2-P53. En este caso, ARF actúa como supresor tumoral mediante el bloqueo del ciclo celular y a través de la activación de la muerte celular programada o apoptosis de aquellas células que presentan alteraciones en su ADN, o en aquellos casos en los que diversos oncogenes o la pérdida de RB estimulan la proliferación celular aberrante. La ARF participa en el proceso regulador que controla los niveles de la proteína p53 a través de la proteína MDM2 (*mouse double minute 2*), que genera la ubiquitinación de esa molécula antioncogénica. La ARF se une a MDM2, que como consecuencia genera un cúmulo de p53^{40,41}. Dicha proteína genera entonces un bloqueo del ciclo celular en G2-M, permitiendo la reparación o la inducción de apoptosis del ADN alterado. El déficit de ARF produce la pérdida de la función supresora de p53 e incrementa la acumulación de ADN alterado, con el desarrollo de un proceso neoplásico maligno^{40,41}. Un hecho destacado es que, a diferencia de la mayoría de los procesos neoplásicos, la pérdida de función de

p53 no es debida a una mutación directa sobre la misma, sino que es el resultado de un fenómeno secundario relacionado, entre otros, por la pérdida de función de ARF^{40,41}.

Diversos estudios concluyen que las alteraciones en INK4A y ARF se desarrollan de forma independiente a pesar de originarse por la mutación de un mismo *locus* (9p22) y actúan a través de vías diferentes en la regulación del ciclo celular. La ARF alterada es discretamente más eficiente que INK4A mutada en el desarrollo de un proceso neoplásico. No obstante, en ambos casos resulta necesaria la combinación de mutaciones en diferentes vías de regulación celular para el desarrollo de MM, bien INK4A-/ARF-, bien otras múltiples combinaciones posibles³⁷.

PTEN, regulador negativo de la fosfatidilinositol-3-quinasa y muerte celular

La vía del regulador negativo de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)-AKT es detectada frecuentemente en un estado de hiperactivación en el MM. Esta vía actúa como segundo mensajero intracelular de múltiples factores de crecimiento o integrinas extracelulares, que se unen a receptores quinasa dependientes, que como resultado generan un aumento de la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas⁴².

Actualmente se ha descrito que el grado de activación de esta vía, traducido en unos niveles elevados de AKT fosforilada, se correlaciona de forma adversa con la supervivencia global⁴³. Este hecho resalta la importancia de esta vía en el desarrollo de la enfermedad.

El principal problema que surge en el estudio de esta vía reguladora es que, a diferencia de la MAPK, no se han conseguido identificar aquellos componentes clave que regulan esta compleja cascada de eventos. De estos, el único que se ha podido caracterizar parcialmente es el PTEN supresor tumoral.

El *locus* de PTEN, ubicado en el brazo largo del cromosoma 10, es una región cromosómica que frecuentemente se encuentra alterada principalmente en forma de deleciones homocigotas, tanto en el MM como en otros cánceres⁴⁴. Presenta una función supresora tumoral mediante la codificación de una lipoproteín-fosfatasa intracelular que atenúa la activación de la vía del fosfatidil-inositol fosfato (PIP₃). La mutación de esta molécula genera una pérdida de control de la vía PIP3-AKT, generando un crecimiento celular incontrolado e inhibición de la apoptosis celular.

En la misma línea de alteraciones en esta vía reguladora del crecimiento celular se ha descrito la existencia de mutaciones constitutivas activadoras de AKT, que han demostrado un potencial oncogénico importante en la transformación maligna del MM⁴. Dicha mutación se ha detectado con mayor frecuencia en la fase de crecimiento radial del MM⁴⁵.

Tercera fase: MITF, MSH y diferenciación melanocítica

Clark propuso que en la evolución natural de un nevus melanocítico la diferenciación celular permite el desarrollo óptimo de esta proliferación celular benigna. Por ello, el fallo de este fenómeno es un dato necesario para la aparición de displasia. En esta fase de diferenciación se requiere la activación de determinados genes encargados de la regulación del ciclo celular y de la producción del pigmento melánico.

MITF-1, factor de transcripción asociado a la microoftalmía

El factor de transcripción asociado a la microoftalmía (MITF) se encarga de regular el desarrollo y la diferenciación de los melanocitos, así como de mantener las células germinales melanocíticas en edades adultas. Su completa deficiencia se traduce en la ausencia de melanocitos, lo que sugiere que esta proteína es imprescindible para la supervivencia y proliferación melanocítica^{46,47}. La regulación de la supervivencia se lleva a cabo mediante la participación de múltiples factores de transcripción, de los cuales destaca el incremento de la expresión del gen Bcl-2, con función antiapoptótica⁴⁸. La diferenciación celular, con la adquisición de la capacidad de producción de pigmento por el melanocito, es una función en la que MITF-1 desempeña un papel clave. La estimulación de MC1R (receptor de MSH en melanocitos) por alfa-MSH (hormona estimulante de melanocortina) genera una señal intracelular que incrementa la expresión de MITF-1, que secundariamente genera una regulación positiva de los reguladores de transcripción de aquellos genes encargados de la síntesis del pigmento: tirosinasa, tirosin-related-protein 1 y dopacromo tautomerasa⁴⁹. Esta proteína también regula la transcripción de genes específicos del melanocito tales como *silver homologue* (SILV) y melan-A (MLANA)⁵⁰, cuya expresión inmunohistoquímica es utilizada en algunos casos en la identificación del MM. Por último, esa molécula genera una inducción de INK4A, que actúa como una proteína supresora de la proliferación celular⁵¹.

La principal alteración genómica del MITF detectada en el MM es una amplificación o ganancia genética en la región del cromosoma 3p14-3p13⁴⁶. Esta amplificación ha sido detectada en un 10% de los MM primarios y en un 15-20% de los MM metastásicos⁴⁶. Su amplificación conlleva una alteración en la maduración de los melanocitos, así como una proliferación celular excesiva. La importancia de esta mutación se objetiva en los últimos estudios, en los que correlacionan el grado de ganancia genética con una menor supervivencia a los 5 años, así como una mayor resistencia al tratamiento quimioterápico⁵². Por ello, el bloqueo de esta proteína podría servir de diana para mejorar la respuesta terapéutica.

Señal MSH, hormona estimulante de melanocortina

La vía molecular modulada por MSH representa uno de los más importantes reguladores de la pigmentación. La MSH se une al receptor Mc1R de forma competitiva con la proteína *agouti*; esta última de poca importancia en la especie humana⁵³.

MC1R es un receptor formado por 7 proteínas G transmembrana que se expresa en los melanocitos epidérmicos. Se trata de una macroproteína que muestra un gran polimorfismo, por lo que su variación alélica es el determinante principal en el fenotipo y fototipo cutáneo en la especie humana⁵⁴.

Existen 3 variantes comunes del Mc1R que se asocian con el fenotipo pelirrojo, que caracteriza a aquellos individuos que presentan el pelo rojo secundario a la producción de feomelanina en detrimento de eumelanina, piel clara e incapacidad para el bronceado, con tendencia a desarrollar nevus⁵⁵. La presencia de este tipo de receptor se asocia a una disminución de la capacidad de defensa de la piel frente a la luz UV y un mayor riesgo de desarrollo de MM. Sin embargo, el hecho de que exista un grupo poblacional que presenta este tipo de receptor, acompañado de un fenotipo oscuro y que tienen un riesgo de MM casi idéntico a aquellos con tez clara, sugiere la existencia de funciones adicionales de este receptor no asociadas a la producción de pigmento en el desarrollo de MM⁵⁶.

Los diferentes receptores MC1R (receptor de melanocortina) transducen intracelularmente el estímulo generado por α -MSH mediante el aumento intracelular de AMPc. Este incremento de AMPc actúa activando múltiples vías de transcripción, que a su vez activan la expresión del MITF-1 en el melanocito⁵⁷. Otras consecuencias, incluyendo la activación de RAF/MAPK y la inhibición de PI3K, han sido descritas. La producción y maduración del pigmento desde feomelanina a eumelanina dependerá de la estimulación del MITF-1 a través de la activación de una vía tirosinasa-dependiente.

Cuarta fase: alteración en la adhesión celular e invasión; las cadherinas e integrinas

La invasión local y el desarrollo de metástasis son responsables de la morbimortalidad en el MM. En el modelo de Clark esta fase se corresponde con el crecimiento vertical de la proliferación melanocítica atípica y su posterior invasión linfovascular hasta llegar a los diferentes órganos.

Desde el punto de vista molecular este fenómeno de invasión y diseminación se relaciona con alteraciones en la adhesión celular. Dentro de las proteínas relacionadas con esta función, las cadherinas y las integrinas desempeñan un papel fundamental. Por último, en esta fase de crecimiento

vertical la detección de mutaciones en genes como melastatin 1 (TRPM1), cuya función es todavía hoy desconocida, se detectan en fases finales del desarrollo en las que el MM adquiere capacidad de diseminación a distancia, de forma que su reducción o ausencia de expresión se correlaciona con la capacidad metastásica de la tumoración.

Cadherinas

Las cadherinas son proteínas transmembrana que mantienen el contacto intercelular mediante la asociación con diversas proteínas intracelulares, principalmente la β -catenina, y que participan en la transmisión de diversas señales intracelulares. Se definen tres tipos de cadherinas, que incluyen la variante epitelial (E-cadherina), presente en los queratinocitos y melanocitos; la variante placentaria (P-cadherina) y la variante neural (N-cadherina) presente en las células del mesénquima.

Diversos estímulos generan la disociación de β -catenina provocando la pérdida de adhesión celular. Dentro de las diferentes vías que generan este fenómeno se incluye la alteración en la denominada *wingless-type mammary tumor virus integration-site family* (WNT). WNT son proteínas con importante papel en el desarrollo germinal, principalmente en el sistema nervioso. Actúan inactivando la *glycogen synthase kinase 3* (GSK3 kinasa), molécula implicada en la degradación de la β -catenina⁵⁸. La acumulación de esta proteína en el núcleo de los melanocitos se une al *lymphoid enhancer factor-T cell factor* (LEF-TCF) y genera un aumento en la expresión de MITF-1 y de CCND1, así como de metaloproteinasa 7 (MMP-7), lo que conlleva un aumento de la proliferación y migración celular⁵⁹. A diferencia del efecto descrito de la WNT como regulador positivo de la expresión de MITF-1, estudios genéticos han identificado la vía señalizadora WNT5a como una importante vía en la progresión del MM⁶⁰. Su expresión se ha correlacionado con la capacidad invasiva de las células melanocíticas neoplásicas, por lo que un bloqueo en su receptor (receptor *frizzled 5*) podría ser capaz de inhibir la capacidad invasiva⁶⁰.

La progresión del crecimiento vertical conlleva la sustitución de la E-cadherina por la N-cadherina⁶¹, que permite la diseminación metastásica por su interacción con otras proteínas de la misma familia localizadas en el mesénquima dérmico y extracutáneo. Paralelamente, el aumento de la N-cadherina genera un cúmulo nuclear secundario de la β -catenina, con el efecto proliferativo secundario ya conocido^{62,63}.

Integrinas

Las integrinas son proteínas que median el contacto celular con los diferentes componentes del mesénquima⁶⁴. La transición desde la fase de crecimiento radial a vertical se

asocia con la expresión de V β 3 integrina⁶⁵. Esta induce la expresión de metaloproteinasa de la matriz tipo 2 (MMP 2), enzima que degrada el colágeno dérmico⁶⁶⁻⁶⁸. Junto a ello incrementa la expresión del gen antiapoptótico Bcl2 y estimula la movilidad de las células melanocíticas^{69,70}.

Utilidad práctica del estudio molecular en el melanoma

La biología molecular en la diferenciación de lesiones melanocíticas complicadas: nevus de Spitz frente a melanoma spitzoide

El melanoma spitzoide es una variedad de MM infrecuente que comparte características histopatológicas con el nevus de Spitz. La diferenciación entre ambos resulta importante tanto desde el punto de vista clínico como legal, ya que la naturaleza biológica del primero es similar a la del resto de MM, con capacidad de diseminación a distancia^{71,72}. El melanoma spitzoide es una tumoración maligna que afecta tanto a niños como a adultos. En edad infantil, aunque el MM en general es poco frecuente, en la mayoría de los casos se manifiesta en forma de melanoma spitzoide. Este dato sumado al hecho de la elevada prevalencia del nevus de Spitz en la infancia hace que en ocasiones se plantee un verdadero problema diagnóstico^{73,74}. Actualmente no se conoce ningún rasgo histopatológico o inmunohistoquímico aislado diagnóstico de MM. Todo ello hace del diagnóstico diferencial entre el nevus de Spitz y el melanoma spitzoide una fuente clásica de controversia en dermatopatología^{75,76}.

En los últimos años se han llevado a cabo múltiples trabajos basados en el estudio molecular de ambas lesiones, con la finalidad de caracterizarlas genéticamente y con ello facilitar el diagnóstico diferencial. Sin embargo, existe un sesgo de selección importante en la mayoría de estos trabajos comparativos entre el nevus de Spitz y el melanoma spitzoide, dado que en ellos se incluyen en múltiples ocasiones MM de apariencia no spitzoide, que en la práctica clínica no generan problemas en el diagnóstico histopatológico. No obstante, los resultados obtenidos en diferentes estudios concluyen una serie de datos interesantes que tendrán que ser corroborados en futuros ensayos (tabla 1).

Como ha sido comentado previamente, la mayoría de los MM, principalmente los localizados en áreas de fotoexposición intermitente, presentan con frecuencia mutaciones del gen BRAF (70%) o del gen NRAS (20%)⁷⁷. Dicha mutación aparece con una frecuencia idéntica o incluso superior en los nevus melanocíticos, lo que hace suponer que estas dos mutaciones sólo son el inicio de la alteración de otras muchas vías reguladoras del ciclo celular de los melanocitos⁷⁸⁻⁸⁵. La mayoría de los estudios coinciden en afirmar que estas mutaciones aparecen poco

Tabla 1. Diagnóstico diferencial molecular del nevus de Spitz/melanoma spitzoide

Tipo de lesión melanocítica	Nevus de Spitz	Melanoma spitzoide
Mutación BRAF/NRAS	No*	Sí*
Mutación HRAS	Sí	No
Ganancia de 11p	Sí	No
Alteraciones cromosómicas distintas de 11p	No	Sí

*Según la mayoría de las series.

frecuentemente en el nevus de Spitz⁸⁶⁻⁸⁸, aunque no todas las series obtienen estos resultados.

Por otro lado, según estudios recientes el nevus de Spitz no suele asociar aberraciones cromosómicas, salvo ganancias en el brazo corto del cromosoma 11 en un porcentaje aproximado del 10% de los nevus de Spitz, a diferencia del MM, que muestra aberraciones cromosómicas con frecuencia y distintas de la ganancia del 11p⁸⁹. Posteriormente se detectaron mutaciones en el gen HRAS asociadas a ganancias en el 11p—el locus del gen HRAS se localiza en el brazo corto del cromosoma 11— con mayor frecuencia en nevus de Spitz, en contraste con la ausencia de las mismas en el melanoma spitzoide²⁰. Por otro lado, estudios mediante inmunohistoquímica demostraron una elevada expresión de la proteína p16 en el nevus de Spitz, una proteína inhibidora del ciclo celular, que podría tener un papel importante en la inducción de la senescencia celular que impediría la transformación maligna de esta lesión melanocítica⁹⁰.

En definitiva, el estudio mediante técnicas de biología molecular supone una vía alternativa futura que puede complementar el estudio histológico de aquellas lesiones en las que la dermatopatología no permite establecer con claridad el diagnóstico diferencial. De forma resumida se puede considerar que la presencia de ganancias en el brazo corto del cromosoma 11, o de mutaciones del gen HRAS en una lesión spitzoide dudosa, debe orientarnos hacia el nevus de Spitz, mientras que la presencia de aberraciones cromosómicas distintas de las ganancias en el 11p apunta hacia el MM. Por último, la presencia de mutaciones de los genes BRAF o NRAS en una lesión spitzoide dudosa hace menos probable el diagnóstico del nevus de Spitz que el de MM, pero con una fiabilidad menor que las alteraciones genéticas previamente descritas.

La biología molecular como base de una nueva clasificación del melanoma

El estudio genético del MM ha mostrado la existencia de determinadas mutaciones distribuidas de forma no aleato-

rizada en función de la localización del MM. Este hecho sugiere la existencia de diferentes vías en el desarrollo del MM en respuesta a diversos factores todavía por definir.

Dentro de los factores de riesgo conocidos para el desarrollo del MM, la exposición a los rayos UV es considerada un factor causal mayor, aunque la relación entre el riesgo y la exposición es compleja. En función de este factor Curtin et al⁷⁷ proponen una nueva clasificación del MM en la que la heterogeneidad clínica se explica por la existencia de distintos tipos de MM desde el punto de vista genético, que muestran una diferente susceptibilidad a la luz UV.

Los resultados mostraron diferencias entre distintos grupos de MM agrupados según el grado de fotoexposición solar en: MM localizado en la superficie cutánea sometida a fotoexposición intermitente, que no muestra signos de daño solar en el análisis histológico (MEI), MM en piel sometida a fotoexposición crónica o con marcada elastosis solar en el estudio histológico (MEC), MM en mucosas y MM acral⁷⁷ (tabla 2).

Melanoma acral y en mucosas

Los MM localizados en mucosas o en la región acral presentan una mayor frecuencia de alteraciones cromosómicas, principalmente en forma de amplificaciones, que se detectaron en el 89% de los MM acrales y en el 85% de los MM de mucosa. La elevada frecuencia de dichas alteraciones en ambas localizaciones sugiere un mecanismo similar en el desarrollo del MM. Sin embargo, las mutaciones afectaron a diferentes regiones genómicas, lo que se justifica por las diferentes características histopatológicas y biológicas de las regiones afectas (tabla 2)⁷⁷.

Este grupo de MM se caracterizó por una baja frecuencia de mutaciones en BRAF y N-RAS. Por el contrario, la existencia de ampliaciones en el cromosoma 12q14, que expresa la CDK4, y que actúa incrementando la actividad de CCND1 o ciclina D1, se detectó más habitualmente en este tipo de tumores. A su vez, estos MM mostraron mayor frecuencia de pérdidas del locus CDKN2A frente a los MEC o MEI. La delección homocigota de este locus se observó en casos sin amplificación de CDK4, lo que sugiere la independencia de esta última para el desarrollo de este tipo de MM⁷⁷.

Recientemente se ha descrito que hasta el 40% de los MM en mucosa y el 36% de los MM acrales presentan mutación o incremento del número de copias de KIT, importante oncogén en el MM⁹¹.

Melanoma en piel sometida a fotoexposición intermitente frente a aquella sometida a fotoexposición crónica

La presencia de alteraciones cromosómicas, principalmente en forma de ganancias o pérdidas, fue un fenómeno infrecuente

Tabla 2. Distribución del melanoma según el patrón de alteraciones moleculares

Tipo de melanoma según el grado de fotoexposición	Localizaciones (porcentaje de distribución)	Aberraciones cromosómicas	Mutaciones en el genoma		
			BRAF	RAS	C-KIT
Melanoma en área e fotoexposición intermitente (MFI)	Tronco (50%) Pierna (30%) Brazo (15%) Cabeza (2,5%)	Amplificaciones: ausentes Aumento n. ^o copias: 6p, 7, 8q, 17q, 20q Disminución n. ^o copias: 9p, 10 , 21q	59%	22%	0%
Melanoma en área de fotoexposición crónica (MFC)	Cabeza (70%) Tronco (10%) Brazo (10%)	Amplificaciones: ausentes Aumento n. ^o copias: 6p, 11q13, 17q, 20q Disminución n. ^o copias: 6q, 8p, 9p, 13, 21q	11%	15%	28%
Melanoma en mucosa	No definido	Amplificaciones: 1q31, 4q12, 12q14 Aumento n. ^o copias: 1q, 6p, 7, 8q, 11q13, 17q, 20q Disminución n. ^o copias: 3q, 4q 6q, 8p, 9p, 10, 11p, 11q, 21q	11%	5%	39%
Melanoma acral	Región plantar (75%) Subungueal (20%) Región palmar (20%)	Amplificaciones: 5p15, 5p13, 11q13, 12q14 Aumento n. ^o copias: 6p, 7, 8q, 17q, 20q Disminución n. ^o de copias: 6q, 9p, 10, 11q, 21q	23%	10%	36%

Aparecen **en negrita** las mutaciones cromosómicas más frecuentes.

y los genes implicados son diferentes, según la existencia o no de signos de daño solar crónico. De esta forma las ganancias cromosómicas en el MEC se observan con mayor frecuencia en el *locus* de la ciclina D1 (CCND1) y en el cromosoma 22, mientras que las pérdidas alélicas se identifican principalmente en el brazo corto del cromosoma 4. Por el contrario, las ganancias génicas en el cromosoma 10q fueron las aberraciones más frecuentes en el MEI (tabla 2)⁷⁷.

La presencia de mutaciones activadoras de BRAF y N-RAS se relacionan fundamentalmente con MEI. Las mutaciones de BRAF se asociaron con frecuencia a deleciones de PTEN, hecho que no ocurrió en aquellos pacientes que mostraron mutación de N-RAS. Ello implica que, a diferencia de N-RAS, la mutación activadora de BRAF requiere la activación de otras vías para el desarrollo de la neoplasia⁷⁷.

Por el contrario, y al igual que los MM localizados en mucosa o en regiones acras, el MEC presenta con mayor frecuencia aumento de número de copias de CCND1 o ciclina D1 y mutaciones en KIT⁹⁰, siendo la prevalencia de mutaciones en BRAF muy baja⁷⁷.

Importancia de la clasificación del melanoma según alteraciones moleculares

La importancia de esta clasificación radica en su aplicación práctica, dado que puede permitir tanto una mayor preci-

sión en la definición del pronóstico, como una mejor selección del paciente en el momento de la aplicación de las nuevas terapias dirigidas frente a dianas moleculares del MM (ver el apartado «Futuras terapias dirigidas contra las dianas moleculares del melanoma»). La clasificación histológica actual del MM, que distingue las 4 variantes clásicas (MM de extensión superficial, MM nodular, lentigo maligno melanoma y MM acral) no es ampliamente aceptada. Las razones son que, por una parte, un considerable número de MM no se pueden clasificar en ningún tipo de patrón clásico. Por otro lado, su clasificación dentro de alguno de estos tipos no supone ninguna implicación pronóstica. De esta forma, tanto el pronóstico como el tratamiento del MM se establecen fundamentalmente mediante el índice de Breslow y otros datos histológicos, como son la presencia de ulceración de la epidermis o la existencia de signos de regresión.

La clasificación del MM en función de la existencia o no de determinadas mutaciones genéticas permitirá en un futuro no muy lejano el establecimiento de un pronóstico más exacto, así como la posibilidad de predecir una mayor o menor respuesta de cada lesión a cada uno de los tratamientos dirigidos contra las diferentes dianas moleculares en desarrollo. Así, el grupo de MEI, que representa el tipo más común de MM, presenta con frecuencia mutación de BRAF asociado con pérdida de PTEN o mutación aislada

de N-RAS. En estos pacientes será esperable la respuesta terapéutica a fármacos que actúen sobre estas dianas, como sorafenib⁹². Por el contrario, la mayoría de los MM en los otros 3 grupos definidos previamente no presentan mutaciones en BRAF o N-RAS, pero se asocian a un aumento del número de copias de CCND1 o CDK4 o las recientemente descritas mutaciones en C-KIT⁹¹. Esta última mutación supone la diana terapéutica de fármacos inhibidores de C-KIT ya utilizados en otros procesos neoplásicos, principalmente el mesilato imatinib⁹³.

Futuras terapias dirigidas contra las dianas moleculares del melanoma

Situación actual

En la actualidad el manejo del MM cutáneo es limitado. Mientras que el MM cutáneo primario puede ser tratado a menudo de forma efectiva con tratamiento quirúrgico, la supervivencia a los 5 años de pacientes con afectación linfática locoregional se encuentra en el 50%. La forma diseminada representa una de las patologías oncológicas más resistentes a los tratamientos quimioterápicos convencionales, que incluyen dacarbacina (DTIC), hidroxiurea y

con menor importancia temozolomida, con una supervivencia media de 6 a 9 meses.

Los recientes avances en la caracterización molecular del MM suponen el desarrollo de una farmacopea dirigida a diferentes dianas clave en la génesis y el mantenimiento del proceso neoplásico. Este nuevo grupo de tratamientos, que actúan de forma específica sobre diferentes vías moleculares, suponen un halo de esperanza en la optimización del control de los pacientes con MM diseminado, con la finalidad de alargar tanto el periodo libre de enfermedad como su esperanza de vida. Paralelamente, el conocimiento de los diferentes patrones genéticos del MM nos permitirá predecir la respuesta individualizada del paciente frente a un determinado fármaco, lo que conducirá a una mejor selección del grupo poblacional a incluir en futuros ensayos clínicos.

Terapia dirigida contra dianas moleculares: BRAF, CRAF y C-KIT

Aunque actualmente existen fármacos que actúan sobre múltiples dianas moleculares (tabla 3), los que bloquean los genes BRAF, CRAF y C-KIT son los más ampliamente estudiados mediante múltiples ensayos clínicos.

Tabla 3. Arsenal terapéutico frente a las dianas moleculares del melanoma

Grupo	Mecanismo de acción	Nombre comercial
Inhibidor de BRAF	Bloqueo de la vía de la MAPquinasa mediante bloqueo BRAF	Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®) ⁷⁹ RAF (RAF-265) ⁸⁰ PLX4032
Inhibidor de C-RAF	Bloqueo de la vía de la MAPquinasa mediante el bloqueo del C-RAF, regulador de NRAS	Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®) ⁷⁹
Inhibidor de C-KIT	Bloqueo del receptor C-Kit presente con frecuencia en MM de áreas no fotoexpuestas	Mesilato imatinib (Glivec®)
Inhibidores de MEK	Bloqueo de las MEK 1 y 2 serín-treonina kinasas	Inhibidor de MEK de primera generación: CI-1040 (Pfizer®) ⁸¹ Inhibidor de MEK de segunda generación: PD0325901 ⁸²
Inhibidores de la vía PI3Kinasa/AKT	Bloqueo de mTOR ⁸³ , que actúa como activador intermedio de AKT y de PI3 quinasa en pacientes con déficit de PTEN	Inhibidor de m-TOR: rapamicina
Inhibidores de quinasas ciclina-dependientes	Bloqueo de la vía p16/CDK/Rb, mediante el bloqueo principalmente de CDK2 ⁸⁴	Inhibidor de CDK1, CDK2, CDK4 y 7: Flavopiridol ⁸⁵ Otros inhibidores selectivos: – UCN-01 – CYC202 – BMS-387032
Reguladores de la homeostasis proteica	Bloqueo de Hsp 90 chaperona, proteína que media en la activación de múltiples proteínas señalizadoras y activadores transcripcionales ⁸⁶	Geldanamicina ⁸⁶ IPI-504 (17-alilaminogeldanamicina, variante menos tóxica que la previa) ^{20,87-89}
Inhibidor de Bcl-2	Bloqueo de Bcl-2, molécula antiapoptótica	Oblimersen (Genesense®, G3139) solo o combinado con dacarbacina (DTIC) ^{77,90,91}

MM: melanoma.

Bloqueo selectivo de BRAF

La prevalencia de mutaciones activadoras de BRAF y NRAS, y la consecuente activación de ERK, sugiere que la activación de la vía MAPK constituye un escalón obligatorio en la malignización en un gran porcentaje de MM. Dicha dependencia hace que esta pueda ser una diana terapéutica vulnerable en el control del MM. Varias líneas de investigación al respecto apoyan esta suposición, particularmente en aquellos MM que presentan la mutación del BRAF^{V600E}. En primer lugar, la vía de la MAPK muestra una activación constitutiva en el BRAF^{V600E} de los melanocitos problema^{94,95}. En segundo lugar, la depleción de BRAF mediante el bloqueo de la expresión del ARN inhibe tanto la activación de ERK como del crecimiento celular, así como genera apoptosis de los melanocitos portadores de BRAF^{V600E}^{95,96}. La abolición de la función de N-RAS mediante el bloqueo de la expresión de ARN a su vez también descende los niveles de ERK fosforilada y estimula la apoptosis de melanocitos con la mutación N-RAS⁹⁶.

No obstante, todavía existen serias dudas de que esta vía sea una buena diana terapéutica por varias razones. Por un lado, si bien es cierto que las mutaciones de BRAF ocurren de forma precoz en la génesis del MM, también lo es que esta mutación de forma aislada resulta insuficiente para el desarrollo del MM. Así, se han descrito mutaciones de BRAF asociadas a alteraciones en PTEN, ciclina D1, CDK2, CDK4, MITF y AKT3.

Actualmente se dispone de fármacos que actúan mediante el bloqueo de la MAPK y que fueron desarrollados en el pasado para el tratamiento de otros procesos neoplásicos. Sorafenib (BAY 43-9006) es una bi-aril urea que genera la inhibición tanto de la forma salvaje como de la variante mutante de la BRAF quinasa. Paralelamente también inhibe C-RAF y VEGFR-3 (factor de crecimiento vascular) y en menor intensidad PDGFR, VEGFR-2, c-KIT y FLT3⁹⁷. Se trata de un fármaco actualmente aprobado para el tratamiento del carcinoma renal metastásico, basado en la capacidad que posee para inhibir la angiogénesis.

A pesar de las esperanzas preclínicas iniciales, la eficacia clínica preliminar obtenida a través de ensayos clínicos en fase II ha sido discreta. Sin embargo, el desarrollo de nuevas moléculas de pequeño tamaño inhibitoras de BRAF (RAF-265⁹⁸, PLX4032) que exhiben una mayor eficacia *in vitro* que su predecesor, hace albergar ciertas esperanzas de la eficacia del bloqueo de esta vía. No obstante, a diferencia del bloqueo de las vías C-RAF y C-KIT, el bloqueo de BRAF genera un efecto citostático, por lo que su asociación con otras moléculas inhibitoras que generen un efecto citotóxico combinado, tales como sustancias inhibitoras de MEK (AZD6244) o de la vía mTOR (rapamicina), pueden mejorar la eficacia de la terapia génica⁹⁹⁻¹⁰¹.

Por último, la confirmación de la presencia de la mutación BRAF en el paciente previamente a la inclusión del

mismo en próximos estudios permitirá evaluar la verdadera eficacia de este tipo de tratamiento.

Bloqueo C-RAF

Si bien la mutación en BRAF es la alteración más frecuente descrita en la activación anómala de la vía de la MAPK, existen casos en que esta no está presente. Así, el desarrollo de un pequeño grupo de MM parece relacionado con una serín/treonina quinasa, C-RAF¹⁰²⁻¹⁰⁴.

A diferencia de BRAF, que parece actuar casi de forma exclusiva como proteína reguladora en la vía de la MAPK, CRAF actúa en la regulación de múltiples dianas aparte de la ya mencionada, que incluyen: MST-2, ASK-1, factor nuclear B. A su vez, esta molécula regula la apoptosis celular principalmente a través de la regulación de la Bcl-2¹⁰². Por otra parte, aquellos MM portadores de mutación activadora de la N-RAS (por tanto BRAF en estado salvaje o no mutada) dependen del mediador C-RAF para actuar de forma activadora sobre la vía de la MAPK¹⁰⁴.

Por otro lado, a pesar de que los tratamientos actuales van encaminados al bloqueo de la mutación activadora BRAF^{V600E}, se han descrito más de 70 subtipos diferentes de mutaciones de esta molécula. Éstas, a diferencia de la BRAF^{V600E}, presentan una baja actividad, pero a través del C-RAF pueden ser capaces de generar la activación de la MAPK¹⁰⁴.

Por tanto, parece que el bloqueo de la mutación de C-RAF sería útil en aquellos MM con mutación en N-RAS, aquellos con mutación en BRAF no V600E y en aquellos casos que desarrollen resistencia al bloqueo del BRAF^{V600E}. Además, el efecto del bloqueo de esta vía consigue una actividad citotóxica sobre las células que componen el MM, por lo que teóricamente superan la eficacia terapéutica a largo plazo de la mutación de BRAF, que sólo consigue una acción citostática¹⁰⁵. Dentro del arsenal terapéutico actual sorafenib parece un inhibidor más eficaz sobre CRAF que sobre BRAF, por lo que será el tratamiento indicado en este grupo de pacientes¹⁰⁶.

Bloqueo selectivo de c-KIT

El interés en el c-KIT como diana molecular en el tratamiento del MM se ha incrementado recientemente a partir de la identificación un determinado grupo de lesiones melanocíticas malignas que presentan mutaciones activadoras de esta vía. Este conjunto incluye a un gran número de MM que se desarrollan en áreas corporales no fotoexpuestas (MM acral y MM de mucosas), así como los MEC⁷³. Estas lesiones presentan, como ha sido comentado previamente, una baja incidencia de mutaciones en BRAF. Sin embargo, en estos casos las mutaciones en c-KIT son relativamente frecuentes (tabla 2). De hecho, Curtin et al establecen a partir de una serie de pacientes

unas incidencias de esta mutación en el 39% de MM en mucosas, 36% en la región acral y del 28% en MEC⁷⁷.

Imatinib es un inhibidor del receptor tirosín-quinasa que bloquea de forma selectiva la actividad de Bcr-Abl, el receptor del factor de crecimiento plaquetario (PDGFR) y del KIT¹⁰⁷.

Los ensayos iniciales en pacientes con MM diseminado tratados con imatinib no obtuvieron los resultados esperados. Todavía no se conocen los parámetros exactos que permitan predecir una buena respuesta al tratamiento, dado que la presencia de la mutación en dicho receptor no parece ser un factor suficiente para la respuesta clínica. Los últimos estudios afirman que existen dos grupos de MM que presentan una respuesta más favorable al tratamiento mediante imatinib. Por un lado estarían aquellos MM que presentan mutaciones del c-KIT que alteran la codificación del dominio yuxta-membrana de este receptor tirosín-quinasa^{108,109}. Esta alteración es la misma que aparece en otros cánceres que responden satisfactoriamente al tratamiento con imatinib, tales como tumores digestivos GIST. El segundo grupo de MM con buena respuesta a imatinib se correspondería con aquellos que, en ausencia de mutaciones conocidas en el gen KIT, muestran una sobreexpresión de la forma fosforilada del receptor KIT asociada a una sobreexpresión de CDK4¹¹⁰.

Por tanto, parece que el máximo beneficio del tratamiento con imatinib aparece en MM en los que la actividad c-KIT constituye la principal vía activadora en la supervivencia y proliferación celular, generando un efecto citotóxico sobre aquellas células que presentan alteración del c-KIT¹⁰⁵.

Conclusión

Los últimos años han supuesto un progreso en la definición de nuevas subcategorías del MM basadas principalmente en alteraciones moleculares objetivadas mediante estudios de biología molecular.

Su identificación permitirá en un futuro no muy lejano el establecimiento de la mayor o menor importancia de los diferentes factores de riesgo en el desarrollo del MM. Por otra parte, el conocimiento del esqueleto genético de las diferentes lesiones permitirá enfocar diagnósticos que histológicamente pueden resultar difíciles o incluso imposibles, como ocurre en determinados casos de nevus de Spitz y su diferenciación con el melanoma spitzoide.

La utilización de agentes terapéuticos contra las diferentes dianas moleculares supone una nueva vía terapéutica para una tumoración maligna diseminada en la que las terapias convencionales no han conseguido alcanzar la esperanza de vida.

Actualmente los ensayos clínicos se centran principalmente en el uso de inhibidores frente a BRAF; sin embar-

go, el bloqueo de una sola vía molecular del MM no parece ser suficiente para alcanzar una buena respuesta clínica a largo plazo. Junto a ello existe suficiente evidencia como para afirmar que el tratamiento a largo plazo mediante inhibidores de BRAF conlleva el desarrollo de resistencia. Por ello, el siguiente paso en la terapia molecular en el MM debe comenzar por una buena caracterización genética de la lesión a tratar.

Los futuros estudios de terapia génica deben ser realizados en grupos de pacientes analizados prospectivamente, en los que se detecte previamente la presencia de aquellos cambios genéticos somáticos sobre los que van a actuar los medicamentos. Junto a ello habrá que conseguir elaborar fármacos con niveles de toxicidad y tolerancia suficientemente bajos como para permitir ser combinados y, con ello, bloquear todas aquellas vías moleculares que estén perpetuando la lesión. En esta línea están en funcionamiento ensayos clínicos en los que se combinan inhibidores de C-KIT y sorafenib (inhibidor C-RAF) en aquellos MM con mutaciones BRAF de baja actividad (no V600E).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Greene MH, Van Horn MA. Study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 1984;15:1147-65.
2. Takata M, Goto Y, Ichii N, Yamaura M, Murata H, Koga H, et al. Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in acral melanomas. *J Invest Dermatol*. 2005;125:318-22.
3. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Palmer AA, Zhang XD, et al. Activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway in human melanoma. *J Clin Pathol*. 2005;58:1163-9.
4. Chudnovsky Y, Adams AE, Robbins PB, Lin Q, Khavari PA. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet*. 2005;37:745-9.
5. Hoeflich KP, Gray DC, Eby MT, Tien JY, Wong L, Bower J, et al. Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. *Cancer Res*. 2006;66:999-1006.
6. Libra M, Malaponte G, Navolanic PM, Gangemi P, Bevelacqua V, Proietti, et al. Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell Cycle*. 2005;4:1382-4.
7. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:1878-90.
8. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33:19-20.
9. Uribe P, Wistuba II, González S. BRAF mutation: A frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol*. 2003;25:365-70.

10. Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, Vallacchi V, Campi V, Di Stasi D, et al. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene*. 2004;23:5968-77.
11. Kumar R, Angelini S, Snellman E, Hemminki K. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol*. 2004;122:342-8.
12. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1753-7.
13. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6:313-9.
14. Chudnovsky Y, Adams AE, Robbins PB, Lin Q, Khavari PA. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet*. 2005;37:745-9.
15. Uribe P, Wistuba II, González S. Allelotyping, Microsatellite Instability, and BRAF Mutation. Analyses in common and atypical melanocytic nevi and primary cutaneous melanomas. *Am J Dermatopathol*. 2009;31:354-63.
16. Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev*. 1999;12:3467-81.
17. Papp T, Pemsel H, Zimmermann R, Bastrop R, Weiss DG, Schiffmann D. Mutational analysis of the N-ras, p53, p16INK4a, CDK4, and MC1R genes in human congenital melanocytic naevi. *J Med Genet*. 1999;36:610-4.
18. Jafari M, Papp T, Kirchner S, Diener U, Henschler D, Burg G, et al. Analysis of ras mutations in human melanocytic lesions: activation of the ras gene seems to be associated with the nodular type of human malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1995;121:23-30.
19. Van Elsas A, Zerp SF, van der Flier S, Kruse KM, Aarnoudse C, Hayward, et al. Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am J Pathol*. 1996;149:883-93.
20. Bastian BC, LeBoit PE, Pinkel D. Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am J Pathol*. 2000;157:967-72.
21. Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2144-53.
22. Sharpless NE, Kannan K, Xu J, Bosenberg MW, Chin L. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene*. 2003;22:5055-9.
23. Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res*. 2005;65:4005-11.
24. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2005;365:687-701.
25. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994;264:436-40.
26. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368:753-6.
27. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, et al. Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res*. 1996;56:5023-32.
28. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*. 2003;22:3113-22.
29. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275:1943-7.
30. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*. 1997;15:356-62.
31. You MJ, Castrillon DH, Bastian BC, O'Hagan RC, Bosenberg MW, Parsons R, et al. Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1455-60.
32. Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*. 1999;340:1341-8.
33. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. A meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41:28-44.
34. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. B. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 2005;41:2040-59.
35. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet*. 1994;8:15-21.
36. Chin L. The genetics of malignant melanoma: Lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:559-70.
37. Sharpless NE. Ink4a/Arf links senescence and aging. *Exp Gerontol*. 2004;39:1751-9.
38. Tsao H, Zhang X, Kwitkiwski K, Finkelstein DM, Sober AJ, Haluska FG. Low prevalence of germline CDKN2A and CDK4 mutations in patients with early-onset melanoma. *Arch Dermatol*. 2000;136:1118-22.
39. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366:704-7.
40. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:8292-7.
41. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998;92:713-23.
42. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24:273-85.
43. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol*. 2005;23:1473-82.
44. Bastian BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: From fields to cancer. *Oncogene*. 2003;22:3081-6.
45. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*. 2004;64:7002-10.

46. Garraway LA, Sellers WR. From integrated genomics to tumor lineage dependency. *Cancer Res.* 2006;66:2506-8.
47. Steingrimsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferré-D'Amaré AR, Burley SK, Zimring DC, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet.* 1994;8:256-63.
48. Banerjee D. Genasense. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001;2: 574-80.
49. Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* 2000;14:1712-28.
50. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol.* 2003;163: 333-43.
51. Loercher AE, Tank EMH, Delston RB, Harbour JW. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol.* 2005;168:35-40.
52. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436:117-22.
53. Lamason RL, Mohideen MA, Mest JR, Wong AC, Norton HL, Aros MC, et al. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science.* 2005;310:1782-6.
54. Sturm RA. Skin colour and skin cancer—MC1R, the genetic link. *Melanoma Res.* 2002;12:405-16.
55. Flanagan N, Healy E, Ray A, Philips S, Todd C, Jackson IJ, et al. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2531-7.
56. Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC, et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: Is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet.* 2000;66: 176-86.
57. Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, et al. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol.* 1998;142:827-35.
58. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol.* 2001; 11:R792-R4.
59. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* 2004;18:2225-30.
60. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell.* 2002;1: 279-88.
61. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1996;1:188-94.
62. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell.* 2005;16:4386-97.
63. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 2001;61:3819-25.
64. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24:195-222.
65. Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Brocker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology.* 1994;24:249-56.
66. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 1996; 85:683-93.
67. Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19:427-36.
68. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alpha(v) beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol.* 2000;115:625-32.
69. Petitclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, et al. Integrin alpha(v) beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 1999;59: 2724-30.
70. Li X, Regezi J, Ross FP, Blystone S, Ilic' D, Leong SP, et al. Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. *J Cell Sci.* 2001;114: 2665-72.
71. Fabrizi G, Massi G. Spitzoid malignant melanoma in teenagers: an entity with no better prognosis than that of other forms of melanoma. *Histopathology.* 2001;38:448-53.
72. Mones JM, Ackerman AB. Melanomas in prepubescent children: review comprehensively, critique historically, criteria diagnostically, and course biologically. *Am J Dermatopathol.* 2003;25:223-38.
73. Wechsler J, Bastuji-Garin S, Spatz A, Bailly C, Cribier B, Andrac-Meyer L, et al. Reliability of the histopathologic diagnosis of malignant melanoma in childhood. *Arch Derm.* 2002;138:625-8.
74. Barnhill RL, Argenyi ZB, From L, Glass LF, Maize JC, Mihm MC Jr, et al. Atypical Spitz nevi/tumors: lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma, and prediction of outcome. *Hum Pathol.* 1999;30:513-20.
75. Mones JM, Ackerman AB. «Atypical» Spitz's nevus, «malignant» Spitz's nevus, and «metastasizing» Spitz's nevus: a critique in historical perspective of three concepts flawed fatally. *Am J Dermatopathol.* 2004;26:310-33.
76. Barnhill RL. The Spitzoid lesion: rethinking Spitz tumors, atypical variants, 'Spitzoid melanoma' and risk assessment. *Mod Pathol.* 2006;19:S21-33.
77. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2135-47.
78. Palmedo G, Hantschke M, Rutten A, Mentzel T, Hugel H, Flaig MJ, et al. The T1796A mutation of the BRAF gene is absent in Spitz nevi. *J Cut Pathol.* 2004;31:266-70.

79. Saldanha G, Purnell D, Fletcher A, Potter L, Gillies A, Pringle JH. High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int J Cancer*. 2004;111:705-10.
80. Mihic-Probst D, Perren A, Schmid S, Saremaslani P, Komminoth P, Heitz PU. Absence of BRAF gene mutations differentiates spitz nevi from malignant melanoma. *Anticancer Res*. 2004;24:2415-8.
81. Gill M, Cohen J, Renwick N, Mones JM, Silvers DN, Celebi JT. Genetic similarities between Spitz nevus and Spitzoid melanoma in children. *Cancer*. 2004;101:2636-40.
82. Turner DJ, Zirvi MA, Barany F, Elenitsas R, Seykora J. Detection of the BRAF V600E mutation in melanocytic lesions using the ligase detection reaction. *J Cut Pathol*. 2005;32:334-9.
83. Van Dijk MC, Bernsen MR, Ruiters DJ. Analysis of mutations in B-RAF, N-RAS, and H-RAS genes in the differential diagnosis of Spitz nevus and spitzoid melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1145-51.
84. Takata M, Lin J, Takayanagi S, Suzuki T, Ansai S, Kimura T, et al. Genetic and epigenetic alterations in the differential diagnosis of malignant melanoma and spitzoid lesion. *Br J Dermatol*. 2007;156:1287-94.
85. Hay R, MacRae E, Barber D, Khalil M, Demetrick DJ. BRAF mutations in melanocytic lesions and papillary thyroid carcinoma samples identified using melting curve analysis of polymerase chain reaction products. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:1361-7.
86. Fullen DR, Poynter JN, Lowe L, Su LD, Elder JT, Nair RP, et al. BRAF and NRAS mutations in spitzoid melanocytic lesions. *Mod Pathol*. 2006;19:1324-32.
87. La Porta CA, Cardano R, Facchetti F, Presicce P, Rao S, Privitera E, et al. BRAF V599E mutation occurs in Spitz and Reed naevi. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20:1164-5.
88. Indsto JO, Kumar S, Wang L, Crotty KA, Arbuckle SM, Mann GJ. Low prevalence of RAS-RAF-activating mutations in Spitz melanocytic nevi compared with other melanocytic lesions. *J Cut Pathol*. 2007;34:448-55.
89. Bastian BC, Wesselmann U, Pinkel D, Leboit PE. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi shows clear differences to melanoma. *J Invest Dermatol*. 1999;113:1065-9.
90. Maldonado JL, Timmerman L, Fridlyand J, Bastian BC. Mechanisms of cell-cycle arrest in Spitz nevi with constitutive activation of the MAP-kinase pathway. *Am J Pathol*. 2004;164:1783-7.
91. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:4340-6.
92. Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8:219-25.
93. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*. 2003;21:4342-9.
94. Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF (V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res*. 2003;63:5198-202.
95. Karasarides M, Chiloeches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene*. 2004;23:6292-8.
96. Eskandarpour M, Kiaii S, Zhu C, Castro J, Sakko AJ, Hansson J. Suppression of oncogenic NRAS by RNA interference induces apoptosis of human melanoma cells. *Int J Cancer*. 2005;115:65-73.
97. Ahmad T, Eisen T. Kinase inhibition with BAY 43-9006 in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6388S-92S.
98. Jallal B. Targeted therapeutics in melanoma: Changing the front end of drug development. *Keystone symposia. Advances in the understanding and treatment of melanoma*. 2006. Abstract n.º 011. p. 26.
99. Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1136-44.
100. Tran MA, Gowda R, Sharma A, Park EJ, Adair J, Kester M, et al. Targeting V600EB-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. *Cancer Res*. 2008;68:7638-49.
101. Lasithiotakis KG, Sinnberg TW, Schitteck B, Flaherty KT, Kulms D, Maczey E, et al. Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2008;128:2013-23.
102. Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, Nguyen TK, Flaherty KT, Letrero R, et al. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *Oncogene*. 2009;28:85-94.
103. Dumaz N, Hayward R, Martin J, Ogilvie L, Hedley D, Curtin JA, et al. In Melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res*. 2006;66:9483-91.
104. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116:855-67.
105. Smalley KSM, Nathanson KL, Flaherty KT. Genetic subgrouping of Melanoma reveals new opportunities for targeted therapy. *Cancer Res*. 2009;69:3141-244.
106. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, 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;64:7099-109.
107. Huang S, Luca M, Gutman M, McConkey DJ, Langley KE, Lyman SD, et al. Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene*. 1996;13:2339-47.
108. Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, La Rosée P, Paschka P, Sucker A, et al. Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2005;92:1398-405.
109. Lutzky J, Bauer J, Bastian BC. Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21:492-3.
110. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, MacRae S, Kruse A, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:2046-51.