

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

Tesis doctoral

**ESTUDIO DE LA MUTACIÓN BRAF^{V600} EN EL MELANOMA CUTÁNEO
PRIMARIO Y METASTÁSICO. CORRELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-
PATOLÓGICAS.**

Autora

Elena Godoy Gijón

Directores

Dr. Ángel Santos-Briz Terrón

Dra. Manuela Yuste Chaves



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

DR. D. ÁNGEL SANTOS-BRIZ TERRÓN PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CELULAR Y PATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DRA. D^a. MANUELA YUSTE CHAVES PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **«Estudio de la mutación BRAFV600 en el melanoma cutáneo primario y metastásico. Correlación con variables clínico-patológicas»** realizado por D.^a Elena Godoy Gijón bajo su dirección en el Departamento de Medicina, reúne, a su juicio, todos los requisitos exigidos para ser presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 11 de diciembre del 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'ASB'.

Fdo. Dr. D. Ángel Santos-Briz Terrón

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Yuste'.

Dra. D^a Manuela Yuste Chaves

“We now understand that it is not sufficient to identify a tumor based on histology or the organ or origin as we have done traditionally, but rather we now need to understand the particular molecular driver of the tumor and select the appropriate therapy.”

Michael Link, Presidente de ASCO 2012

A mi familia y muy especialmente a mis padres por su apoyo y amor incondicional.

A Juan Carlos porque lo importante no es ser iguales, sino hacer un buen equipo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar mi agradecimiento al Dr. Ángel Santos-Briz, como dermatopatólogo y co-director de esta tesis, por la confianza depositada en mí así como su inestimable consejo y orientación en la concepción y el desarrollo de este proyecto. A la Dra. Manuela Yuste por su soporte incondicional y valiosos consejos durante mi formación como dermatóloga así como por su labor como co-directora de esta tesis. Aún en la distancia cada día aprendo con vosotros. Gracias a ambos por haber sido profesores sabios y exigentes a la par que amigos y compañeros. Tantas horas, biopsias, pacientes y quirófanos compartidos me han ayudado a mejorar como profesional y como persona.

A todo el equipo humano del Servicio de Dermatología del Hospital Clínico de Salamanca por esforzarse cada día en que aprendiésemos y trabajásemos juntos. A Estefanía Moyano por su gran aportación a este trabajo en el procesado de las muestras y los estudios moleculares. A mis residentes mayores y pequeños, por el apoyo científico y moral en las horas de trabajo y fuera de ellas. A mi jefe el Dr. Pablo Unamuno y a mi tutora la Dra. Emilia Fernández por tener la paciencia suficiente para enseñarme y contener mi avalancha de preguntas y peticiones. Y especialmente a la Dra. María Teresa Alonso una gran maestra y mejor amiga que siempre será mi “madre adoptiva” dermatológica.

Al Servicio de Enfermedades Infecciosas por el apoyo, confianza y la formación que me habéis proporcionado. Muy especialmente al Dr. Javier Pardo Lledías como tutor en Medicina Interna, por enseñarme que no sólo hay enfermedades sino enfermos. Procuro aplicar todas tus enseñanzas en mi día a día.

A Patricio Suárez, Mercedes Sánchez y M^a Fe Muñoz por explicarme y ayudarme con el análisis estadístico. A los servicios de los hospitales de Ávila, Zamora y Palencia por su colaboración al permitir que trabajásemos con sus muestras e historias clínicas.

A mi familia que son mi soporte y mi fuerza. No importa cuántos kilómetros nos separen, siento que cada día estáis conmigo. A mi padre por tener la paciencia de sentarse a estudiar conmigo cada día al volver del trabajo. Por ser capaz de entenderme y quererme a pesar de todos mis defectos. A mi madre por ser el faro que guía a esta familia. Por

secar mis lágrimas cuando lloraba, cuidarme cuando estaba enferma y calmar mis nervios antes de cada examen. A mi hermano por quererme y sostenerme desde que llegué a este mundo, tu mano me acompañó en mis primeros años y sé que siempre está ahí cuando la necesito. A mis abuelos, por permitir con vuestros esfuerzos que hoy seamos la gran familia en que nos hemos convertido. Espero que podáis estar orgullosos de mí.

A Juan Carlos por apoyarme en esta tesis en todos los aspectos. No hubiese podido terminarla de no haber sido por tu ayuda, con los bloques y las historias clínicas. Todos estos años has sido mi soporte y me has ayudado tanto que no tengo palabras suficientes para agradecértelo. Espero poder hacerlo el resto de nuestra vida.

Finalmente quiero agradecer a todos los pacientes que, de forma directa o indirecta han contribuido y colaborado en este proyecto. Algunos de ellos desgraciadamente ya no están entre nosotros. Espero que este trabajo permita conocer más en profundidad esta enfermedad y que en un futuro dispongamos de mejores tratamientos, técnicas y cuidados que poder proporcionarles.

ABREVIATURAS

AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Proteín kinasa B o PKB
BAP1	<i>BRCA1 associated protein-1</i>
BRAFi	Inhibidor de BRAF
BRAF ^M	Mutación en el gen BRAF
BRAF ^{WT}	Ausencia de mutación en el gen BRAF o BRAF <i>wild type</i>
BSGC	Biopsia selectiva del ganglio centinela
CDKN2A+	Inhibidor 2A de kinasa dependiente de ciclina
CDK4	Kinasa dependiente de ciclina 4
CCD1	Ciclina D1
CEC	Carcinoma epidermoide cutáneo
CFC	Cardio-facio-cutáneo
c-Kit	Receptor del factor de crecimiento de células madre
c-Met	Receptor tirosín-kinasa del <i>hepatocyte growth factor</i> (llamado también HGFR)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DTIC	Dacarbacina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea del Medicamento)
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
FAS	Antígeno de apoptosis 1

FasR	Receptor Fas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLT-3	Fms-related tyrosine kinase-3 o <i>fetal liver kinase</i> (también llamado CD135)
GIST	Tumor gastrointestinal estromal
GNA11	<i>Guanine nucleotide-binding protein</i> (proteína G) <i>Alpha 11</i>
GNAQ	<i>Guanine nucleotide-binding protein</i> (proteína G) <i>Alpha-Q</i>
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H-E	Hematoxilina-eosina
HMB-45	<i>Human Melanoma Black 45</i>
HPV	Virus del papiloma humano
HRAS	Harvey-RAS
IL-2	Interleucina 2
IGF-1R	Receptor 1 del factor de crecimiento de insulina
KRAS	Kirsten-RAS
LMM	Léntigo melanoma maligno
MAPK	Proteín-quinasas mitógeno-activadas
MART-1	<i>Melanoma associated antigen recognized by T-cells</i> (también llamado Melan-A)
MCR	Receptor de la melanocortina
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinasa-ERK</i>
MEKi	Inhibidor de MEK
MES	Melanoma de extensión superficial
MLA	Melanoma lentiginoso acral
MMII	Miembros inferiores

MMSS	Miembros superiores
MN	Melanoma nodular
MTIF	Factor de transcripción asociado a microftalmia
NA	No alcanzado
NRAS	Neuroblastoma-RAS
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD1	<i>Programmed cell death 1 protein</i>
PD-L1	Ligando 1 de la proteína <i>programmed cell death</i>
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado plaquetas
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
POT-1	<i>Protection of telomeres protein-1</i>
QAc	Queratoacantoma
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>
RAS	<i>RAt Sarcomas</i>
RAS ^{WT}	RAS <i>wild type</i> o ausencia de mutación en RAS
RTKs	Receptores tirosín-kinasa
RT-qPCR	PCR a tiempo real
SE	Supervivencia específica
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa

UV	Ultravioleta
VE1	Anticuerpo anti-BRAF ^{V600E}
VEGFR	Receptor del factor del endotelio vascular
VM	Vemurafenib

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.- Alteraciones cutáneas y moleculares en los síndromes asociados a mutaciones germinales en la vía de las MAPK.
- Tabla 2.- Estadificación del melanoma cutáneo según la American Joint Committee on Cancer (AJCC).
- Tabla 3.- Estadificación TNM del melanoma cutáneo de la AJCC.
- Tabla 4.- Alternativas terapéuticas actuales para el melanoma metastásico.
- Tabla 5.-Efectos secundarios más frecuentes en los tratamientos dirigidos para el melanoma metastásico.
- Tabla 6.- Descripción de la muestra: variables clínicas.
- Tabla 7.- Descripción de la muestra: variables anatomopatológicas.
- Tabla 8.-Metástasis ganglionares cuya mutación fue estudiada mediante otras técnicas.
- Tablas 9.- Tumores primarios portadores ($BRAF^{V600E}$) y no portadores de la mutación ($BRAF^{WT}$). Concordancia con sus metástasis.
- Tabla 10.- Asociación de la mutación $BRAF^{V600E}$ en el tumor primario con variables clínicas.
- Tabla 11.- Asociación de la mutación $BRAF^{V600E}$ en el tumor primario con presencia de metástasis y mortalidad por melanoma.
- Tabla 12.- Asociación de la mutación $BRAF^{V600E}$ en la metástasis con variables clínicas.
- Tabla 13.- Asociación de la mutación $BRAF^{V600E}$ en el tumor primario con variables anatomopatológicas.
- Tabla 14.- Asociación de la mutación $BRAF^{V600E}$ en la metástasis ganglionar con variables anatomopatológicas en el ganglio.
- Tabla 15.- Análisis de supervivencia.
- Tabla 16.- Análisis de regresión logística univariante de las variables clínicas que mostraron asociación con valores de $p < 0.1$ en el tumor primario.
- Tabla 17.- Análisis de regresión logística multivariante de las variables clínicas que mostraron asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 18.- Análisis de regresión logística multivariante de las variables histopatológicas que mostraron asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 19.- Análisis de regresión logística univariante de las variables que mostraron asociación con valores de $p < 0.1$ en la metástasis ganglionar.

Tabla 20.- Asociación de la afectación extracapsular y/o necrosis con la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar.

Tabla 21.- Frecuencia de la mutación BRAFV600 en tumor primario y metástasis. Estudios previos.

Tabla.22.- Concordancia de la mutación BRAF^{V600} en tumor primario y metastásico, publicaciones previas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1.- Vía de las MAPK.

Fig.2.- Estudio mediante secuenciación de Sanger del exón 15.

Fig.3.- Síndromes asociados a mutaciones germinales en la vía de las MAPK.

Fig.4.- Clasificación clásica del melanoma cutáneo.

Fig.5.- Nueva clasificación molecular del melanoma.

Fig.6.- DTIC en el tratamiento del melanoma metastásico.

Fig.7.- Curvas Kaplan-Meier de duración de respuesta en el tratamiento del melanoma metastásico con IL-2 iv.

Fig.8.- Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en pacientes tratados con ipilimumab+DTIC frente al grupo tratado con DTIC + placebo.

Fig. 9.- Bloqueo de la señalización de PD-1 o CTLA-4 en la inmunoterapia tumoral.

Fig.10.- Tratamientos dirigidos en melanoma.

Fig.11.- Tasas de respuesta en el estudio BRIM-3 de VM y DTIC.

Fig.12.- Efectos secundarios cutáneos de los BRAFi.

Fig.13.- Ejemplo de un pirograma.

Fig.14.- Técnica de la plataforma Cobas® 4800 BRAF V600.

Fig.15.- Kit y plataforma Cobas® instalada en nuestro laboratorio.

Fig.16.- Informe de la plataforma Cobas® indicando la presencia de la mutación BRAF^{V600}.

Fig.17.- Distribución de los casos según el hospital de procedencia.

Fig.18.- Distribución por sexo de la muestra.

Fig.19.- Distribución de las edades de los pacientes de la muestra.

Fig.20.- Distribución por fototipo de la muestra.

Fig.21.- Localización de la lesión primaria en la muestra.

Fig.22.- Patrón de exposición solar de la lesión primaria en la muestra.

Fig.23.- Frecuencia de quemaduras solares en la infancia de la muestra.

Fig.24.- Antecedentes personales de otra neoplasia.

Fig.25.- Antecedentes familiares de otra neoplasia.

Fig.26.- Frecuencia de los subtipos histológicos de melanoma en la muestra.

Fig.27.- Frecuencia de ulceración histológica en el tumor primario.

Fig.28.- Frecuencia de regresión histológica en el tumor primario.

Fig.29.- Frecuencia de infiltrado inflamatorio en el tumor primario.

Fig.30.- Tipo histológico de metástasis ganglionares.

Fig.31.- Extensión extracapsular y necrosis en metástasis ganglionares.

Fig.32.- Frecuencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario.

Fig.33.- Concordancia entre tumor primario y las distintas metástasis.

Fig.34.- Paciente con dos melanomas primarios.

Fig.35.-Metástasis cutáneas, subcutáneas y cicatriz de linfadenectomía axilar derecha en el mismo paciente.

Fig.36.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con la localización del tumor primario.

Fig.37.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con el patrón de exposición solar.

Fig.38.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con metástasis ganglionares.

Fig.39.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con el subtipo histológico en el tumor primario.

Fig.40.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con la consumición epidérmica en el tumor primario.

Fig.41.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con la invasión perivascular en el tumor primario.

Fig.42.-Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar con la extensión extracapsular.

Fig.43.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar con la necrosis.

Fig.44.-Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global y específica en pacientes portadores de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario.

Fig.45.-Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global y supervivencia específica en pacientes portadores de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis.

Fig.46.-Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión en pacientes portadores de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario y en la metástasis.

Fig.47.- Heterogeneidad intratumoral.

Fig.48.- Algoritmo propuesto para la determinación del estado mutacional de BRAF.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	27
1.	Epidemiología del melanoma	30
2.	La vía de las MAPK: base molecular de la activación en el melanoma	31
3.	La mutación BRAF	34
4.	Nueva clasificación molecular del melanoma	38
5.	Tratamiento del melanoma metastásico y localmente avanzado	43
	5.1. Alternativas terapéuticas	44
	5.2. Inhibidores de BRAF en el tratamiento del melanoma avanzado	50
	5.3. Resistencias y efectos secundarios de los inhibidores de BRAF	54
6.	Correlación mutacional entre tumor primario y metástasis: antecedentes.	58
7.	Métodos de detección de mutaciones en BRAF.....	58
II.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	65
1.	Justificación.....	67
2.	Hipótesis	67
3.	Objetivos.....	68
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	69
1.	Diseño del estudio	71
2.	Descripción de la muestra	71
	2.1. Criterios de selección y descripción de la muestra	71
	2.2. Procesado de las muestras tisulares	72
3.	Variables recogidas	72
	4.1. Variables clínicas	72
	4.2. Variables anatomopatológicas	73
4.	Estudio mutacional de BRAF.....	76
5.	Análisis estadístico	77

IV.	RESULTADOS	79
1.	Estadística descriptiva	81
1.1.	Variables clínicas	81
1.2.	Variables anatomopatológicas	87
2.	Resultados globales del estudio de la mutación	92
2.1.	Frecuencia de la mutación en el tumor primario	92
2.2.	Concordancia mutacional entre el tumor primario y las metástasis	92
2.3.	Asociación de la mutación BRAF ^{V600E} con variables clínicas	96
2.3.1.	Tumor primario y variables clínicas	96
2.3.2.	Metástasis y variables clínicas	100
2.4.	Asociación de la mutación BRAF ^{V600E} con variables anatomopatológicas	101
2.4.1.	Tumor primario y variables anatomopatológicas	101
2.4.2.	Metástasis ganglionar y variables anatomopatológicas	105
2.5.	Valor de la mutación en el tumor primario y la metástasis como factor pronóstico ..	106
2.6.	Regresión logística	109
2.6.1.	Mutación BRAF ^{V600E} en el tumor primario.....	109
2.6.2.	Mutación BRAF ^{V600E} en la metástasis ganglionar	111
V.	DISCUSIÓN	113
1.	La mutación BRAF.....	115
2.	Asociación con variables clínicas	117
3.	Valor pronóstico de la mutación: supervivencia libre de enfermedad, supervivencia específica y supervivencia global	122
4.	Asociación con variables histopatológicas	124
4.1.	Asociación con variables histopatológicas en el tumor primario	124
4.2.	Asociación con variables histopatológicas en la metástasis ganglionar	127
5.	Concordancia mutacional entre el tumor primario y las metástasis	128
VI.	CONCLUSIONES.....	135
VII.	BIBLIOGRAFÍA	139
VIII.	ANEXOS.....	163

I. INTRODUCCIÓN

En 1876 Robert Koch descubrió y comunicó al mundo que las enfermedades infecciosas no estaban causadas por sustancias misteriosas, sino por microorganismos específicos denominados bacterias. Dicho descubrimiento junto con el posterior desarrollo de antibióticos permitió un tratamiento dirigido y específico frente al agente causal de la enfermedad que redujo enormemente la mortalidad por estas patologías.

En 2002 Davies y cols² identificaron BRAF como un oncogén de gran relevancia en el cáncer humano. Se describió entonces una incidencia de mutaciones en BRAF muy superior en el melanoma cutáneo frente a otros tumores. Se apuntaba ya en ese artículo la utilidad que un tratamiento dirigido específicamente contra la actividad de BRAF podría tener importancia en el manejo del melanoma metastásico.

No fue hasta ocho años después cuando Flaherty y colaboradores³ mostraron la efectividad de los inhibidores de BRAF en el tratamiento de estadios avanzados del melanoma. Se estableció entonces una nueva era en el tratamiento de dicha patología, una era en la que el tratamiento no se dirigía indiscriminadamente frente a la división celular, sino que se trataba de un tratamiento personalizado dirigido a las células portadoras de la mutación BRAF.

Mucho se ha publicado desde entonces sobre esta mutación en el melanoma cutáneo, pero sorprendentemente son pocas o casi inexistentes las publicaciones referidas al estudio de la mutación en el tejido metastásico. Asumimos que si el tumor primario se encuentra mutado también lo estará la metástasis, pero dicha afirmación requiere una validación científica y ese ha sido el objetivo de nuestro trabajo.

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA

El melanoma cutáneo representa aproximadamente el 1,5% de los tumores en ambos sexos⁴ pero es el tumor responsable de más del 80% de las muertes por cáncer cutáneo⁵. Su frecuencia es mayor en países desarrollados, con altos niveles de irradiación solar y con una población caucásica no autóctona. En EEUU se trata de la tercera neoplasia más prevalente en varones⁶, afectando a un 7% mientras que en Europa es más frecuente entre las mujeres diagnosticándose aproximadamente 60.000 casos nuevos al año^{7,8}.

En España se diagnostican unos 3.600 nuevos casos anualmente según los datos de GLOBOCAN, reportándose algo más de 600 fallecimientos por melanoma. La tasa ajustada de incidencia es de 5'2 casos por 100.000 habitantes y año⁹. Dicha incidencia se puede considerar elevada, con un ascenso muy importante especialmente desde los años 90. Se trata además de la segunda y tercera neoplasia maligna más frecuente en mujeres y hombres, respectivamente, de entre 20-29 años⁶. El melanoma es también el tumor cuya incidencia ha experimentado un mayor crecimiento en varones en las últimas décadas, sólo superado por el cáncer de páncreas¹⁰⁻¹². Estos datos han generado una alarma médica y social, que ha supuesto una mejoría en la prevención y el tratamiento de la enfermedad, condicionando así que la mortalidad permanezca estable en las estadísticas.

La exposición solar ha sido identificada como el único agente ambiental causal¹², incluyendo en ésta la exposición artificial en cabinas de rayos UVA. La piel clara, el número de nevus adquiridos y la presencia de nevus displásicos son los factores de riesgo constitucionales asociados¹². Por otro lado, algunos estudios muestran que hasta un 11% de los pacientes afectados por melanoma en España tienen antecedentes familiares de melanoma¹³⁻¹⁵.

No se dispone de información actualmente sobre la distribución por estadios, aunque desde el año 1997 se encuentra en activo el Registro Nacional de Melanoma Cutáneo⁸. En un estudio reciente la supervivencia a los 5 años del diagnóstico se estima en un 85%¹⁶, indicando que la mayoría de los tumores se detectan en estadios precoces. La elevada tasa de curación del melanoma cutáneo diagnosticado en fase temprana aleja esta enfermedad de los primeros puestos de mortalidad debida al cáncer^{11, 16}. Este pronóstico es mucho más sombrío en los estadios avanzados, dado que se trata de una patología con un curso agresivo y una elevada refractariedad a la quimioterapia estándar.

2. LA VÍA DE LAS MAPK: BASE MOLECULAR DE LA ACTIVACIÓN EN EL MELANOMA

La vía de las proteínas kinasas mitógeno activadas, también conocida como vía de las MAPK, desempeña un papel fundamental en la supervivencia, crecimiento y migración celular. Actúa como mecanismo de transducción de las señales de la superficie celular hasta el núcleo, mediante procesos de fosforilación.

La disregulación en esta vía en forma de activación constitutiva es un evento frecuente en muchos tumores humanos¹⁷. En los últimos años la vía de las MAPK se ha identificado como una vía de gran relevancia en la estimulación del crecimiento del melanoma, de forma tal que pueden hallarse mutaciones activadoras en la mayor parte de los melanomas cutáneos².

La activación de la vía de la MAPK puede producirse por la adhesión de las integrinas a la matriz extracelular o por la unión de ligandos (factores de crecimiento) a los receptores tirosín-kinasa (RTKs). Estos fenómenos dan lugar a la activación de la guanosina trifosfatasa (GTPasa) RAS (*Rat Sarcomas*) en la cara interna de la membrana celular.

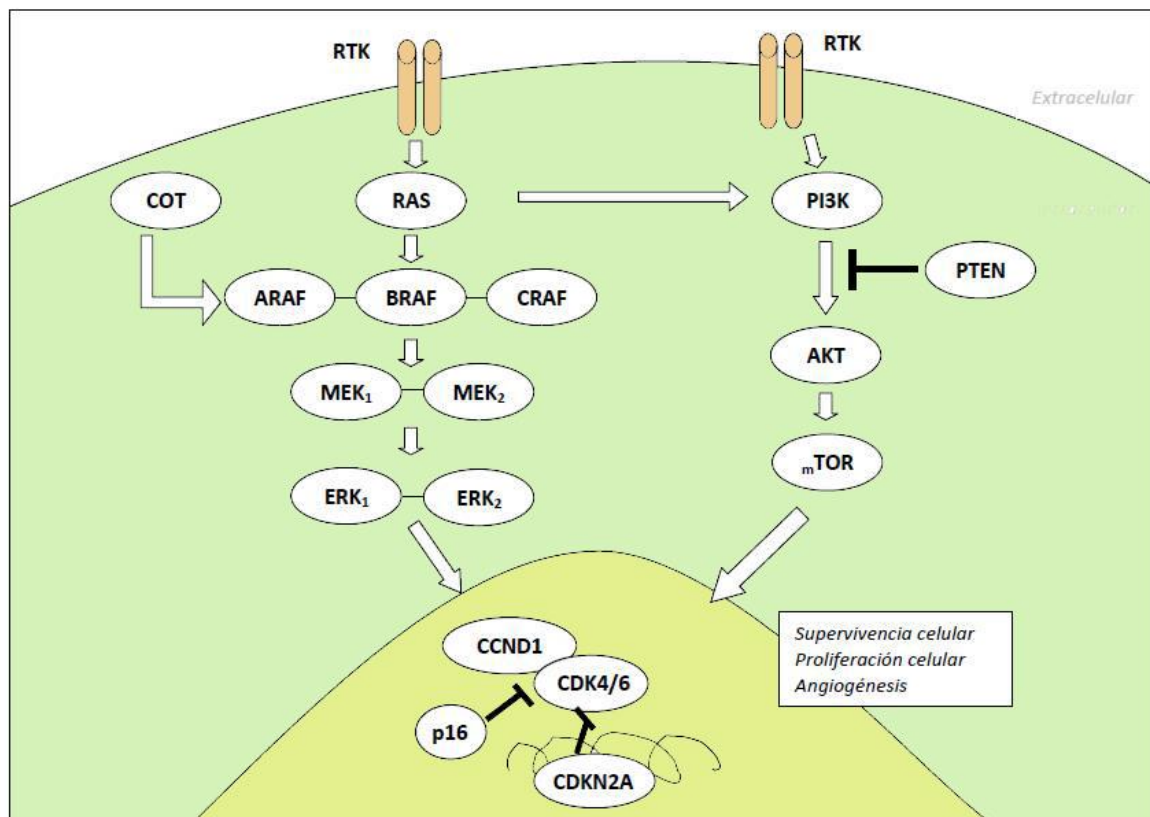


Fig. 1.-Vía de las MAPK.

Los RTKs capaces de activar RAS son una amplia familia, entre ellos encontramos¹⁸⁻²⁰:

- Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)
- Receptor del factor de crecimiento derivado plaquetas (PDGFR)
- Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR)
- Receptor del factor de crecimiento de células madre (c-Kit)
- Receptor del factor de crecimiento del hepatocito (c-Met o HGFR)
- Fms-related tirosin kinasa-3 (FLT-3)
- Receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales codificado por el protooncogén RET.

Tras activarse, RAS actúa sobre sus proteínas efectoras siendo las mejor caracterizadas RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma kinase*) y PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*), aunque actualmente se sabe que RAS es capaz de activar otras vías de señalización²¹. Con la activación de RAS, la proteína BRAF es reclutada a la membrana celular donde es fosforilada, tras lo cual se dimeriza consigo misma (homodimerización) o con otro miembro de la familia RAF como CRAF (heterodimerización)²². La culminación de la cascada se produce con la posterior activación mediante fosforilación de MEK (*mitogen-activated protein kinase-ERK*) y ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) que, a su vez, activa mediante la fosforilación a sus objetivos en el núcleo y citoplasma celular (Fig.1).

La activación de ERK da lugar al aumento en la proliferación (mediante inactivación de los genes supresores tumorales o disminución de las kinasas ciclina-dependientes), la supervivencia (mediante la modulación del factor de transcripción asociado a microftalmia - MTIF), la protección frente a la apoptosis inducida por FAS, la angiogénesis y la capacidad de invasión y metástasis debida a la remodelación de la matriz extracelular²³.

Por otro lado, la activación de PI3K puede producirse directamente por RTKs o a través de RAS. Dichos procesos producen la fosforilación que finalmente resulta en la activación de AKT (proteín-kinasa B o PKB). Esta vía controla la supervivencia celular y la apoptosis, la organización del citoesqueleto y la quimiorresistencia tumoral^{24, 25}. Este proceso se encuentra a su vez regulado por la proteína supresora tumoral PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*)(Fig.1).

La activación constitutiva de la vía MAPK puede deberse a mutaciones en RAS o BRAF, así como a otros mecanismos como la acumulación de proteína RAS no mutada o *wild type* (RAS^{WT}), el

aumento en el acoplamiento de RTKs (por ejemplo c-Kit) con las proteínas RAS, la sobreexpresión de factores de crecimiento o la disminución de supresores de ERK.

La mutación en RAS fue la primera mutación asociada al melanoma que se identificó^{26, 27}. La subfamilia RAS está constituida clásicamente por tres componentes: HRAS (Harvey-RAS), NRAS (Neuroblastoma-RAS) y KRAS (Kirsten-RAS). Las mutaciones en el gen KRAS son frecuentes en las neoplasias malignas de colon o pancreáticas en humanos^{17, 28} y en el gen HRAS se han hallado en nevus de Spitz²⁹, pero es la mutación en NRAS la más frecuente en el melanoma²⁷, aunque en un bajo porcentaje (10-18%)^{26, 30-33}. Dicha mutación también ha sido hallada con una alta frecuencia en nevus congénitos³⁴.

La subfamilia RAF se compone de tres elementos: BRAF, CRAF y ARAF. Los mediadores más importantes en la activación son BRAF y CRAF³⁵. Las mutaciones en BRAF son, por sí solas, capaces de producir la activación constitutiva de la vía, mientras que las mutaciones en CRAF (también llamada RAF1) requieren de eventos adicionales³⁶. Esto explicaría por qué las mutaciones en BRAF son las más frecuentes de esta subfamilia en el melanoma, encontrándose en más del 50% de los casos². Dichas mutaciones pueden presentar la capacidad de activar MEK y ERK en ausencia de activación RAS o de activar CRAF³⁷. Las mutaciones en NRAS y BRAF se consideran mutuamente excluyentes en el melanoma cutáneo^{32, 38-40}, aunque su presencia conjunta ha sido descrito en nevus⁴¹ y en 3 casos de melanoma familiar con mutación del gen CDKN2A (inhibidor 2A de kinasa dependiente de ciclina) responsable de la producción de la proteína reguladora del ciclo celular p16⁴².

La mutación somática en el gen supresor tumoral PTEN situado en el cromosoma 10q, que actúa inhibiendo la activación de AKT, ha sido descrita en el 5-20% de los melanomas⁴³ así como en numerosos tumores. También se observa conjuntamente con mutaciones en BRAF^{44, 45}. Su mutación germinal se asocia a síndromes hereditarios con alto riesgo de cáncer como el síndrome de Cowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclos y el síndrome de Bannayan-Zonana.

Otras alteraciones genéticas menos comunes como la amplificación de la ciclina D1 (CCND1) y la mutación en la kinasa ciclina-dependiente 4 (CDK4) se describen en el melanoma en asociación con la mutación BRAF⁴⁵⁻⁴⁷. La mutación en el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) también ha sido descrita en melanoma cutáneo^{48, 49} y mutaciones en la vía de las MAPK podrían regular su fosforilación y reclutamiento³⁷. En el melanoma uveal, la activación de la vía de las MAPK está regulada por una mutación activadora en GNAQ o GNA11 hasta en un 80% de los casos.

3. LA MUTACIÓN BRAF

La proteína BRAF es uno de los miembros de la vía de las MAPK que más fácilmente se activa con RAS^{50,51}. Su actividad kinasa basal es además superior a la observada en otros miembros de la misma familia^{52,53}. Esto podría explicar por qué la mutación somática que afecta a BRAF es tan frecuente en los tumores humanos².

La alteración en la proteína BRAF produce una activación constitutiva de la vía de las MAPK evitando así la necesidad de activación por parte de RAS. Su mutación genera una actividad kinasa de la proteína diez veces superior a la forma no mutada (BRAF^{WT})^{2, 54}, conduciendo a la proliferación neoplásica mediada por una transcripción continuada. La mutación somática en el oncogén BRAF se ha mostrado más frecuente en el melanoma cutáneo que en otros tumores². Ha sido identificada en el 50-70% de los melanomas, siendo con diferencia la más frecuente en el melanoma cutáneo respecto a otras como NRAS, p16 o p53^{55,56}.

La kinasa BRAF se encuentra codificada en el oncogén BRAF en el cromosoma 7q34². Se trata de un gen constituido por 18 exones. De entre las mutaciones en el gen BRAF, la mutación en un nucleótido en el codón 600 (V600E) en el exón 15 causante de la sustitución de valina por ácido glutámico (GTG>GAG) en la proteína, es la más frecuente ocurriendo hasta en el 85-90% de los casos^{2, 45, 57}. La segunda mutación en frecuencia (V600K) es la que da lugar a la sustitución de valina por lisina (GTG>AAG) con hasta un 20-21% de los casos mutados⁵⁸⁻⁶¹, habiéndose registrado una mayor prevalencia en algunas poblaciones^{58,61}. Otras mutaciones como V600R (GTG>AGG), V600D (GTG>GAT), V600E2 (GTG>GAA), V600A, V600G, K601N, K601E, L597R, L597Q, G596R, D594N son más infrecuentes^{62,63}.

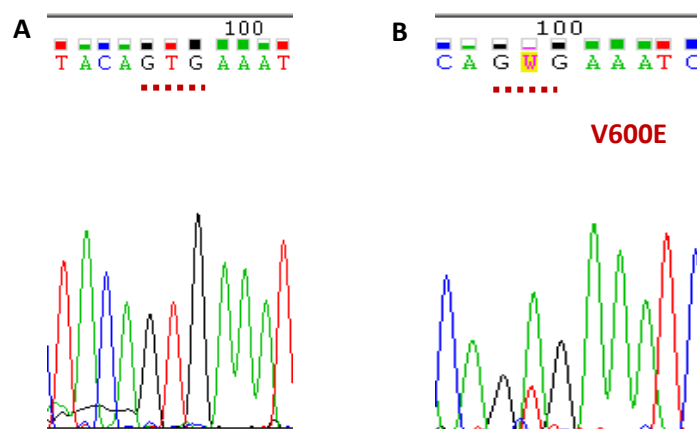


Fig.2.-Estudio mediante secuenciación de Sanger del exón 15. A. Gen no mutado (*wild type*); **B.** Gen portador de mutación T>A (V600E).

A diferencia de los cambios de bases objetivados en la formación de dímeros de pirimidina, relacionados con el cáncer de piel no melanoma, esta mutación no ha podido atribuirse a la exposición solar^{2, 64, 65}. De hecho se ha descrito su presencia en nevus congénitos⁶⁶⁻⁶⁹, nevus adquiridos en áreas no fotoexpuestas⁶⁶ y en otros tumores internos^{2, 57, 70-81}, todos ellos sin relación con la exposición solar.

Hasta el momento se ha referido una mayor frecuencia de la mutación en melanomas invasores y metastásicos (29-50%) frente a melanomas in situ (5.6-10%)^{38, 62}, hecho que por otro lado puede ser atribuido a una mayor frecuencia de lesiones de tipo léntigo melanoma en el último grupo. Se han hallado también mutaciones en BRAF^{V600} en hasta un 89% de nevus benignos^{38, 41, 66}, lo cual hace suponer que la mutación por sí sola no es suficiente para iniciar el melanoma. De hecho, la mayoría de los melanomas se inician de *novo* y no sobre una lesión névica preexistente.

Algunos estudios demuestran la presencia de la mutación en nevus congénitos (86-88%), compuestos (70%), intradérmicos (88%) y displásicos (80%), aunque con un pequeño tamaño muestral⁴¹. En el caso de los nevus congénitos se ha apuntado que aquellos de menor tamaño (<1'5cm) presentan tasas mutacionales superiores a los de mayor tamaño (≥1'5cm) que, en cambio, presentaban con más frecuencia mutaciones en NRAS^{34, 66, 68, 82}. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que los nevus de pequeño tamaño son en ocasiones mal definidos por los pacientes como presentes en la infancia, no sucediendo así con los nevus de gran tamaño. En un reciente estudio se indica que los nevus congénitos mostrarían mutaciones en NRAS pero no en BRAF, siendo aquellos nevus congénitos con mutaciones en BRAF realmente nevus adquiridos con patrón histológico tipo nevus congénito³⁴. La superposición clínica e histopatológica de algunos de estos nevus congénitos de menor tamaño con nevus adquiridos hace difícil determinar la frecuencia real de la mutación en estas lesiones. En cualquier caso la presencia de la mutación BRAF no parece relacionarse con el riesgo de desarrollar melanoma sobre nevus congénito^{66, 82}.

Resulta interesante la ausencia de mutaciones BRAF en la mayor parte de los pacientes estudiados con melanoma familiar^{83, 83}, no considerándose actualmente un gen de susceptibilidad para el desarrollo de melanoma. También lo es el hallazgo de la mutación germinal en BRAF (distinta de la V600E), así como en otros puntos de la vía de las MAPK, en algunos síndromes que actualmente se han agrupado en el término "rasopatías" por su frecuente alteración en RAS^{84, 85} (tabla 1 y fig.3). Estos síndromes, a diferencia de lo que sucede con el alto potencial maligno de las mutaciones somáticas, se caracterizan por alteraciones en el desarrollo del individuo con retraso mental o en el aprendizaje, talla baja, dismorfismo facial, anomalías cardíacas y

alteraciones cutáneas⁸⁶. De entre las alteraciones cutáneas del síndrome Cardio-Facio-Cutáneo (CFC)⁸⁷⁻⁹⁰ es destacable el hecho de que estos pacientes presenten múltiples nevus pigmentados e hiperqueratosis folicular que, como veremos más adelante, son también efectos secundarios que se observan en pacientes tratados con inhibidores de BRAF. La superposición clínica de estas enfermedades podría explicarse por la repercusión de las mutaciones en los mediadores subsecuentes en la vía de las MAPK, manteniendo un fenotipo similar en todas ellas.

SÍNDROME	PROTEÍNA AFECTADA	ALTERACIONES CUTÁNEAS
Sd. Noonan	SHP2, SOS1, KRAS, CRAF, MEK1	Manchas café con leche. Nevus melanocíticos. Linfedema miembros inferiores.
Sd. Cardio-facio-cutáneo	KRAS, BRAF, MEK1, MEK2	Manchas café con leche. Hiperqueratosis folicular. Nevus adquiridos. Xerosis cutánea. Uleritema ofriógenes. Pelo rizado y escaso.
Sd. LEOPARD	SHP2, KRAS, CRAF,	Manchas café con leche. Efélides.
Sd. Costello	HRAS, KRAS	Hiperpigmentación cutánea. Laxitud. Pliegues palmares marcados. Verrugas periorificiales.
Neurofibrom atosis tipo 1	Neurofibromina	Manchas café con leche. Efélides en pliegues. Neurofibromas. Nevus anémicos. Otros tumores cutáneos benignos.
Sd. Legius	SPRED1	Manchas café con leche. Efélides. Lipomas.

Tabla.1.- Alteraciones cutáneas y moleculares en los síndromes asociados a mutaciones germinales en la vía de las MAPK. Adaptado de Hernández-Martín A⁸⁵.

Respecto a otros tumores, se ha detectado la mutación somática en BRAF^{V600} en el adenocarcinoma de colon^{2, 73} esófago⁷⁷ y estómago⁷⁶, carcinoma papilar de tiroides^{71, 80, 81}, gliomas², adenocarcinomas pulmonares^{2, 57, 79, 91}, sarcomas², colangiocarcinoma⁷⁸, ovario^{2, 72}, mama² y neoplasias hematológicas^{74, 75, 92}. Todos ellos presentándola en menor frecuencia que el melanoma cutáneo².

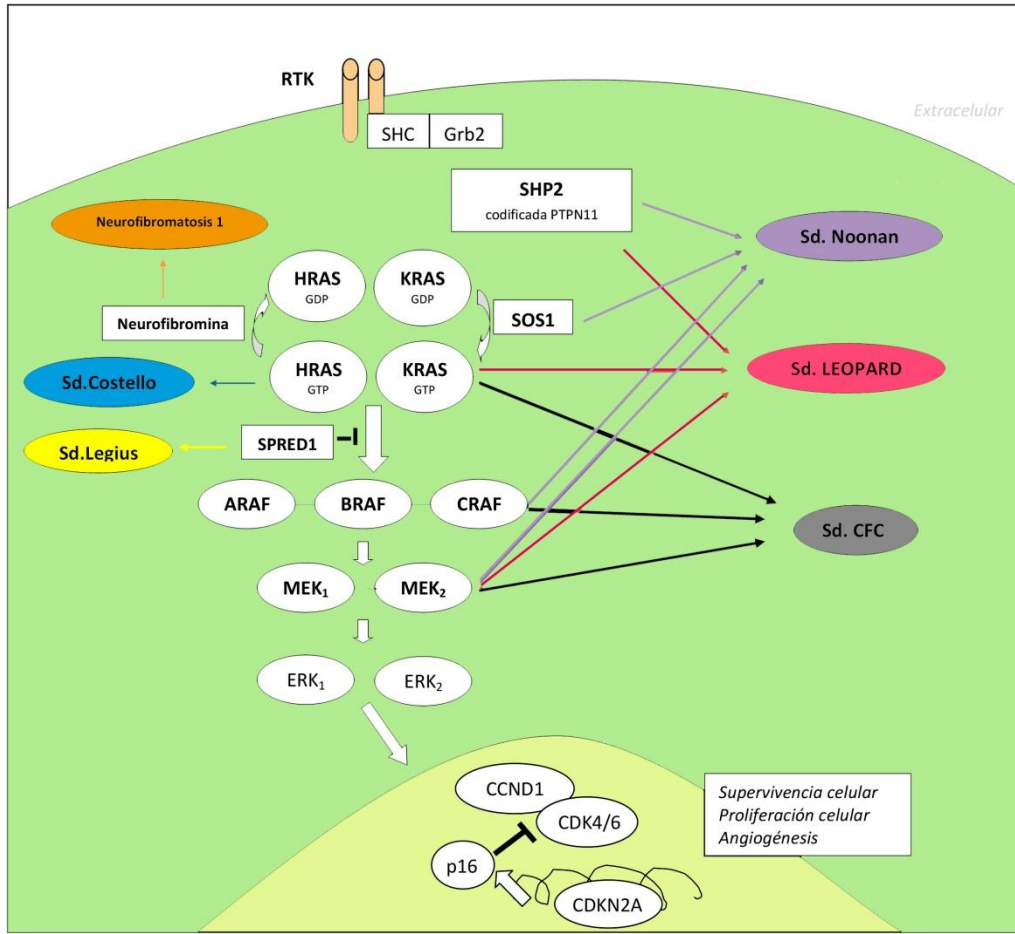


Fig.3.-Síndromes asociados a mutaciones germinales en la vía de las MAPK. Adaptado de Hernández-Martín A⁸⁵.

4. NUEVA CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL MELANOMA

La descripción original del melanoma por René Laennec en 1812⁹³ subdividía ya esta entidad en dos subtipos, la forma firme y la forma blanda. Desde entonces muchas clasificaciones han surgido, siendo la más aceptada en las últimas décadas la llamada clasificación clásica del melanoma cutáneo^{94, 95} que se basa en criterios morfológicos y que ha sido recientemente revisada por la OMS⁹⁶. Esta clasificación, actualmente la más utilizada en la práctica clínica, distingue cuatro tipos de melanoma cutáneo principalmente:

- 1) **Léntigo melanoma maligno (LMM):** presenta una fase de crecimiento radial muy prolongada, pudiendo desarrollar posteriormente una fase de crecimiento vertical. Histológicamente los melanocitos se caracterizan por un crecimiento lentiginoso formando unidades solitarias a lo largo de la capa basal de la epidermis, que dificulta la delimitación entre el componente *in situ* del melanoma y la piel perilesional. Frecuentemente invade estructuras anexas como los folículos pilosos.
- 2) **Melanoma de extensión superficial (MES):** presenta una fase de crecimiento radial prolongada, pudiendo desarrollar posteriormente una fase de crecimiento vertical. Histológicamente se caracteriza por melanocitos de gran tamaño, que se agrupan formando pequeños agregados o nidos; la presencia de estas células dispersas por la epidermis (similar a los hallazgos objetivados en la enfermedad de Paget) se denomina distribución “pagetoide”.
- 3) **Melanoma lentiginoso acral (MLA):** patrón similar al anterior pero desarrollado en zonas acras. Suele asociar con más frecuencia el desarrollo de fase de crecimiento vertical. Frecuentemente invade estructuras apendiculares como las glándulas sudoríparas.
- 4) **Melanoma nodular (MN):** fase de crecimiento radial menos significativa, presenta una fase de crecimiento vertical acelerada.



Fig.4.- Clasificación clásica del melanoma cutáneo: léntigo melanoma maligno (A), melanoma de extensión superficial (B), melanoma lentiginoso acral (C) y melanoma nodular (D)

Otros melanomas no englobados en estos grupos incluyen el melanoma desmoplásico, melanoma spitzoide, melanoma nevoide, melanoma sobre nevus congénito y nevus azul, melanoma en la infancia, melanoma de mucosas y melanoma uveal.

La estadificación tumoral actual del melanoma se encuentra definida fundamentalmente por criterios anatomopatológicos, particularmente el grado de invasión dérmica (índice de Breslow), la ulceración y el número de mitosis de la lesión primaria^{1, 96, 97}, sin incluir los subtipos morfológicos dentro de estos criterios.

La clasificación morfológica, aunque de utilidad en el diagnóstico clínico-patológico y pronóstico, no ha mostrado ninguna repercusión en el tratamiento. La estadificación basándose en criterios anatomopatológicos, sí tiene influencia en el pronóstico y tratamiento del melanoma cutáneo, pero no incluye criterios clínicos que permitan predecir un pronóstico del paciente.

Estadio 0	Tis	N0	M0	Estadio IIIA	T (1-4)a	N1a	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0		T (1-4)a	N2a	M0
Estadio IB	T1b	N0	M0	Estadio IIIB	T (1-4)b	N1-2a	M0
	T2a	N0	M0		T (1-4)a	N1-2b	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0		T (1-4)a	N2c	M0
	T3a	N0	M0	Estadio IIIC	T (1-4)b	N1-2b	M0
Estadio IIB	T3b	N0	M0		T (1-4)b	N2c	M0
	T4a	N0	M0		cualquier T	N3	M0
Estadio IIC	T4b	N0	M0	Estadio IV	cualquier T	cualquier N	M1

Tabla.2.- Estadificación del melanoma cutáneo según la American Joint Committee on Cancer (AJCC)¹.

TUMOR PRIMARIO		GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES		METÁSTASIS A DISTANCIA	
Tx	No puede ser valorado	Nx	No pueden ser valoradas	Mx	No pueden ser valoradas
T0	Sin evidencia	N0	Sin evidencia	M0	Sin evidencia
Tis	Melanoma in situ	N1	1 ganglio a= micrometástasis	M1a	Mtx ganglionares a LDH normal distancia, cutáneas
T1	≤1mm a= ulcerado b= no ulcerado	N2	2-3 ganglios a= micrometástasis b= macrometástasis		o subcutáneas
T2	1'01-2mm a= ulcerado b= no ulcerado	N3	≥4 ganglios o conglomerado adenopático o ganglios + mtx en tránsito	M1b	Mtx pulmonares LDH normal
T3	2'1-4mm a= ulcerado b= no ulcerado			M1c	Mtx en cualquier LDH normal otra víscera
T4	>4mm a= ulcerado b= no ulcerado				Cualquier LDH elevada metástasis a distancia

Tabla.3.- Estadificación TNM del melanoma cutáneo de la AJCC¹. Mtx = metástasis.

Recientemente, en numerosos tumores se ha incluido dentro de su clasificación una categorización basada en el perfil genético, principalmente según sus mutaciones en oncogenes activadores. Algunas de estas patologías son el cáncer de mama (ERBB2 o HER2), carcinoma no microcítico de pulmón (EGFR), cáncer colorrectal (KRAS y NRAS), leucemia mieloide crónica (ABL) y tumores gastrointestinales estromales (KIT). La presencia además de terapias dirigidas frente a determinadas mutaciones o la implicación de estas en el pronóstico del paciente, justifica la introducción del test molecular en la práctica clínica diaria oncológica.

Es por ello que en los últimos años, tras el descubrimiento de la mutación activadora en el oncogén BRAF y la relevancia de la vía de las MAPK, la clasificación clínico-patológica del melanoma está siendo modificada para integrar las alteraciones moleculares recientemente descritas. La actual clasificación molecular del melanoma propuesta por Bastian y cols^{45, 98-101} se estructura en:

- 1) Melanomas cutáneos de piel con exposición solar intermitente: muestran mutaciones en BRAF (54-59%) y N-RAS (22%)^{45, 101}. Se considera que ambas mutaciones son mutuamente excluyentes^{39, 44, 45, 70, 102}, aunque algunos autores apuntan a la posible coexistencia en determinados melanomas⁴². También se ha objetivado pérdida del cromosoma 10 (PTEN) y mutaciones en el receptor de la melanocortina (MCR), asociadas a mutaciones en BRAF.⁴⁵ Aquellos que no presentan ninguna de las dos mutaciones tienen con frecuencia amplificaciones focales de los genes CDK4 o CCND1⁴⁵. Este tipo de melanomas no presentan mutación en KIT¹⁰³ y con escasa frecuencia presentan deleciones en p16 /CDKN2A.⁴⁵
- 2) Melanomas cutáneos asociados a exposición solar crónica: presentan una menor incidencia de mutaciones BRAF^{45, 101} (8-11%) y N-RAS^{45, 101} (15%). Las mutaciones o amplificación en KIT ocurren en hasta un 28% de los casos¹⁰³. Aquellos que no presentan la mutación BRAF o N-RAS con frecuencia presentan amplificaciones en el gen CCND1. Más raramente estos tumores muestran deleciones en p16 /CDKN2A y amplificaciones de CDK4⁴⁵.
- 3) Melanomas cutáneos acrales o de piel no expuesta: muestran también una menor incidencia de mutaciones BRAF (15%-23%)^{45, 101} y N-RAS (10%)⁴⁵. Por el contrario, las mutaciones en KIT son más frecuentes, hallándose en hasta un 36-40%¹⁰³. Estas lesiones presentan con frecuencia otras alteraciones como amplificaciones en la CCND1 y CDK4, así como deleciones en p16 /CDKN2A⁴⁵.
- 4) Melanomas mucosos: asocian amplificación o mutaciones en KIT en el 39-40%¹⁰³ de los pacientes. Un bajo porcentaje puede presentar mutación en BRAF (11%) y NRAS (5%)⁴⁵. También muestran, con mayor frecuencia que las lesiones asociadas a exposición crónica o

intermitente, deleciones en p16 o amplificaciones en CDK4 (siendo ambas alteraciones mutuamente excluyentes)⁴⁵.

- 5) Melanomas uveales, melanomas del sistema nervioso central, melanomas sobre nevus azul, nevus azules y otras neoplasias benignas como el nevus de Ota: se han evidenciado mutaciones en los genes GNAQ y GNA11 que condicionan alteraciones en las proteínas G. De entre estas patologías, GNAQ se encuentra mutado más frecuentemente en el nevus azul (hasta un 80%) y GNA11 más frecuentemente en melanomas uveales, presentando esta última una baja frecuencia en el nevus azul (<10%). La presencia de mutaciones en BRAF, NRAS y KIT en estos melanomas es poco frecuente¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

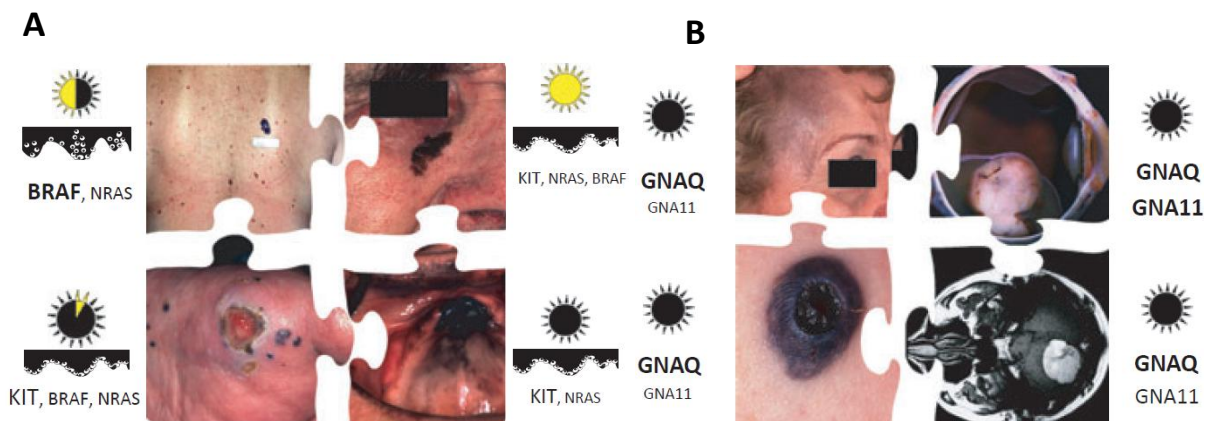


Fig.5.- Nueva clasificación molecular del melanoma. A. Melanomas originados en melanocitos asociados con epitelio (melanoma sobre piel con exposición solar intermitente, sobre piel con exposición solar crónica, acral y mucoso); B. Melanomas originados en melanocitos no asociados con epitelio (nevus de Ota, melanoma uveal, nevus azul maligno y melanocitoma) *Modificado de: Whiteman, Pavan, Bastian. 2011¹⁰⁷.*

El estudio de las alteraciones genéticas de los distintos tipos de melanoma cutáneo según la clasificación de la OMS, ha evidenciado que la mutación BRAF es más frecuente en los subtipos MES, mientras que la mutación KIT es más frecuente en los MLA y LMM^{45, 98, 101, 103, 108}. En un reciente meta-análisis³⁰, se ha hallado asociación significativa del MN con la presencia de la mutación en NRAS, aunque algunos autores apuntan que el MN no sería un subtipo dentro de la clasificación, sino una progresión acelerada de los anteriores¹⁰⁰.

Las mutaciones germinales en el gen CDKN2A en el cromosoma 9p21 son las más reconocidas en el melanoma hereditario^{109, 110} y en los pacientes con melanoma múltiple primario¹¹¹, con hasta un 40% de mutaciones en casos de melanoma familiar¹¹². La presencia de nevus atípicos y síndromes

con cáncer pancreático en la familia aumenta la posibilidad de la detección de dicha mutación¹¹³. La delección que afecta a la proteína p16 es la más frecuente. Otras alteraciones descritas son la mutación que afecta a la proteína p14, la producida en el gen CDK4¹¹⁴, en el promotor de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT)¹¹⁵ y en el gen de protección de los telómeros 1 (POT 1)¹¹⁶,¹¹⁷. Debido a la frecuencia de dichas alteraciones genéticas actualmente se recomienda el estudio genético de CDKN2A en pacientes con ≥ 3 melanomas o con ≥ 2 casos de melanoma o cáncer de páncreas en la misma familia⁶².

Recientemente, las mutaciones germinales en el gen supresor tumoral BAP1 (*BRCA1-associated protein-1*) localizadas en el cromosoma 3p21 se han relacionado con una susceptibilidad aumentada para el desarrollo de melanoma uveal y cutáneo, lesiones cutáneas atípicas clínicamente spitzoides con celularidad epiteliode, mesoteliomas con un curso más indolente, carcinoma de células claras renales, adenocarcinoma de pulmón, meningiomas y otros tumores¹¹⁸⁻¹²⁰. En estos pacientes, a la mutación germinal de herencia autosómica dominante, se le suma la pérdida de heterocigosis debida a una segunda mutación o delección dando lugar al desarrollo de dichos tumores. Los tumores melanocíticos que desarrollan, frecuentemente pierden la expresión nuclear de BAP1 y muestran asociada la presencia de la mutación BRAF^{V600E}. Estas lesiones melanocíticas fueron inicialmente clasificadas como spitzoides debido a su aspecto papuloso con coloración rosa-anaranjada y su celularidad epiteliode de predominio dérmico¹¹⁸. Posteriormente la ausencia de cuerpos de Kamino, hipergranulosis, melanocitos fusiformes y hendiduras alrededor de los nidos melanocíticos junturales, así como la presencia de mutaciones en BRAF (típicamente ausentes en los nevus de Spitz¹²¹) en hasta el 88% de estos tumores ha hecho que algunos autores sugieran que se trata de una entidad diferente¹²⁰. Las mutaciones somáticas en BAP1 se han descrito en numerosos tumores¹¹⁹. En las lesiones melanocíticas se ha demostrado su presencia en melanoma primario cutáneo (2.5-5%)^{120, 122}, melanoma desmoplásico (2.5-22%)^{120, 122}, melanoma metastásico (9%)¹²⁰, nevus compuestos¹²³, nevus spitzoides^{124, 125} y nódulos proliferativos sobre nevus congénito (8%) sin haberse hallado en nevus congénitos¹²⁰.

La integración de las características clínicas, histopatológicas y genéticas de los melanomas en una clasificación común sería de gran utilidad en la valoración conjunta del pronóstico, tratamiento y seguimiento de estos pacientes. Algunos autores se atreven ya a postular que la determinación de las mutaciones en BRAF debería estudiarse en todos los pacientes con melanoma en estadio IV y estadio IIIc irreseccable sistemáticamente¹²⁶, aunque dicha afirmación aún no se encuentra reflejada en las guías de práctica clínica de esta patología.

5. TRATAMIENTO DEL MELANOMA METASTÁSICO Y LOCALMENTE AVANZADO.

En los últimos doce años las herramientas terapéuticas disponibles para el tratamiento del melanoma y del cáncer en general han variado notablemente. Los antiguos tratamientos para el cáncer tenían como objeto la destrucción del DNA y la división celular, asumiendo que las células neoplásicas se dividen más rápidamente que las sanas, hecho que no es constante en todos los tumores. Estos tratamientos conllevaban también una importante repercusión en sistemas de alto recambio celular como el hematológico, mucoso o digestivo.

El estudio de la biología tumoral ha permitido conocer más en detalle las alteraciones y vías más específicas que subyacen en el proceso de desarrollo y proliferación de las células tumorales. Estos nuevos conocimientos han sido la clave para la aparición de nuevas terapias dirigidas a dichas alteraciones, que han mostrado mejores resultados clínicos y menos efectos secundarios.

En el caso concreto del tratamiento del melanoma metastásico, la dacarbacina (DTIC) ha sido utilizada durante años como tratamiento quimioterápico estándar desde su aprobación en 1976 en Europa¹²⁷. Su utilización ha sido amplia, a pesar de unas tasas de respuesta bajas, una elevada toxicidad y un mínimo impacto en la supervivencia. Uno de los mayores descubrimientos en el campo del melanoma en los últimos años ha sido la implicación biológica de la vía de las MAPK. El desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos, tomando como modelo alteraciones genéticas tumorales en esta vía, sí ha mostrado unos resultados significativamente superiores.

Actualmente, tras muchos años en los que había escasas opciones terapéuticas para los pacientes con melanoma metastásico, se dispone por fin de nuevas herramientas de tratamiento con resultados superiores. Estos fármacos han supuesto una nueva línea terapéutica esperanzadora, especialmente teniendo en cuenta las bajas tasas de respuesta que presentaban los tratamientos clásicos.

5.1. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

La dacarbacina ha sido considerada el tratamiento estándar para el melanoma metastásico desde 1976¹²⁷. Su aprobación por la FDA se basó en estudios en fase III que mostraron una tasa de respuesta del 7 al 24% y una supervivencia media global de 4.6 a 7.8 meses tras el inicio del tratamiento¹²⁸⁻¹³³. La tasa de respuesta completa a los 5 años era del 1.38%¹³⁴, aumentando hasta el 5% en aquellos estudios que incluían pacientes en estadio III¹³⁵. Posteriores quimioterapias combinadas y bioquimioterapias no mostraron resultados superiores^{131, 132, 132, 136}.

		Median survival (mos)
No. of patients treated	126	4.6
No. of responders	20	11.3
Women	14	13.7
Men	6	7.3
No. of nonresponders	106	3.6
1-yr survival		
Responders	50%	
Nonresponders	9.5%	

Fig.6.- DTIC en el tratamiento del melanoma metastásico. Datos obtenidos de Carter SK y cols¹³⁷.

En la década de los noventa, la introducción de la inmunoterapia para el tratamiento de los tumores metastásicos tuvo su repercusión en el campo del melanoma. La utilización de vacunas y, más recientemente, interleucina-2 (IL-2) a altas dosis mostró unas tasas de respuesta elevadas en casos muy seleccionados¹³⁸ (<50 años, pocas comorbilidades, ausencia de lesiones en sistema nervioso central, poca masa tumoral, LDH normal), lo cual motivó su aprobación por la FDA aunque no por la EMA (aunque sí fue aprobado para otros tumores). La tasa respuesta objetiva evidenciada en este último fármaco fue del 16% (IC 95%, 12% a 21%) con un 6% de remisión completa y un 10% de respuestas parciales, con una mediana de duración de la respuesta de 8.9 meses¹³⁸. La toxicidad de la IL-2 intravenosa por otro lado era muy elevada de forma tal que en la mayor parte de los centros se administraba en la Unidad de Cuidados Intensivos. Los efectos más frecuentes de este fármaco eran hipotensión (64%), taquicardia supraventricular (17%), infecciones (15%), distrés y alteraciones respiratorias graves (4%), hiperbilirrubinemia (2%), coma (1%), gastrointestinales y alteraciones del comportamiento. Esta toxicidad se mostró reversible tras finalizar el tratamiento, pese a todo la mortalidad por el tratamiento alcanzó un 2.2%¹³⁸.

Recientemente se han obtenido tasas de respuesta y una supervivencia libre de enfermedad superiores con la combinación de IL-2 con la vacuna gp100:209-217(210M), alcanzando una supervivencia media de 17.8 meses¹³⁹.

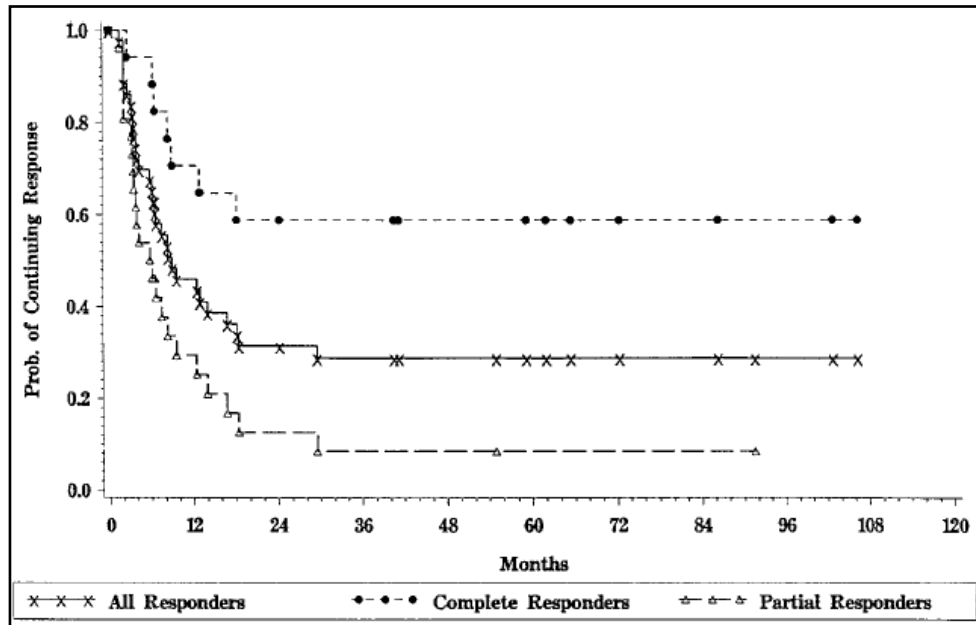


Fig.7.- Curvas Kaplan-Meier de duración de respuesta en el tratamiento del melanoma metastásico con IL-2 iv. Pacientes que alcanzaron respuesta completa y parcial en ensayo clínico con 270 pacientes tratados con IL-2 intravenosa. Obtenido de *Atkins MB y cols*¹³⁸.

En los últimos años se han incorporado a esta área terapéutica nuevas inmunoterapias más específicas de las vías inmunorreguladoras tumorales y el microambiente intratumoral. El antígeno 4 asociado a los linfocitos T-citotóxicos (CTLA-4) se ha descubierto de gran importancia en la inmunosupresión durante la tumorigénesis¹⁴⁰, habiéndose mostrado que su bloqueo puede suprimir la inhibición tumoral de la activación y proliferación de las células T, estimulando la destrucción de células tumorales¹⁴¹. El inhibidor de CTLA-4 llamado ipilimumab ha mostrado una supervivencia media de entre 10.2 -11.4 meses¹⁴² (superior en 4 meses frente a un grupo control con vacunas¹⁴³), una mediana de supervivencia libre de progresión de 11 semanas y una tasa de respuesta objetiva de entre 5'8-11'1%^{142, 144}. La combinación de ipilimumab + DTIC frente a DTIC + placebo ha mostrado además una supervivencia a 3 años de 20.8% frente a 12.2% respectivamente (HR: 0.72; p<0.001)¹⁴⁵. En un estudio que comparaba la utilización de ipilimumab y gp-100 en monoterapia con la combinación de ambos, se objetivó que el 60% de los pacientes en monoterapia con ipilimumab mantenían una respuesta objetiva de al menos 2 años (26.5% a 44.2 meses)¹⁴³. La toxicidad de esta medicación mostró efectos adversos en un 10-15% de los

pacientes especialmente intensos (grado 3-4) a nivel gastrointestinal y cutáneo, manejables y generalmente reversibles con corticoterapia sistémica. La mortalidad secundaria al tratamiento osciló entre un 2.1-2.5% según los estudios¹⁴²⁻¹⁴⁴. Ipilimumab se encuentra actualmente aprobado por la FDA (desde marzo del 2011) y por la EMA como tratamiento en segunda y primera línea (desde julio del 2011 y noviembre del 2013 respectivamente). En España se encuentra aprobado en segunda línea desde octubre del 2012 y primera línea desde abril del 2015. Los datos obtenidos del uso expandido en nuestra población recogidos en el informe de posicionamiento terapéutico reflejan que los pacientes candidatos a este tratamiento serían aquellos con baja carga tumoral, lenta progresión y poco sintomáticos.

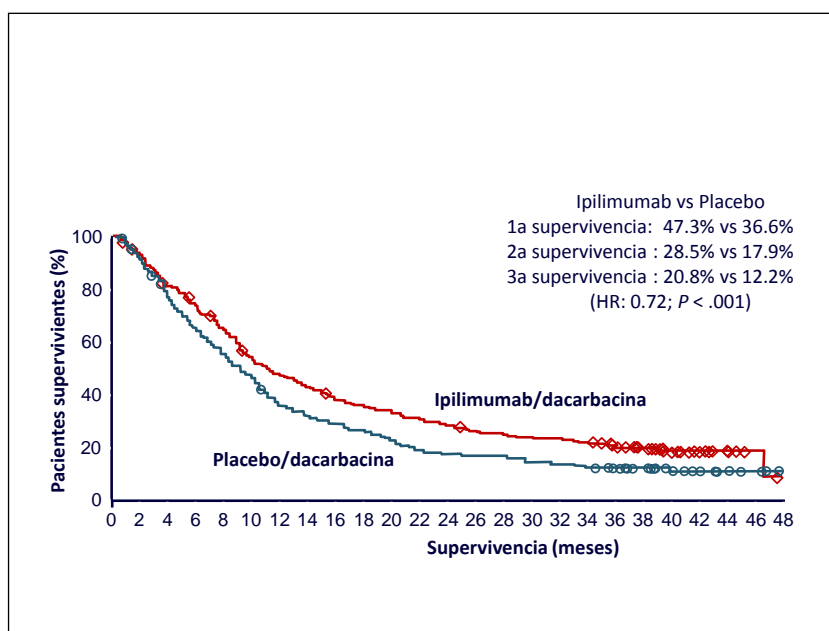


Fig.8.- Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en pacientes tratados con ipilimumab+DTIC (n=250) frente al grupo tratado con DTIC + placebo (n=252). Modificado de Robert C. y cols.¹⁴⁵

La proteína *programmed cell death 1* (PD-1) es otro receptor inhibidor de las células T. Presenta dos ligandos conocidos: PD-L1 (también llamado B7-H1 o CD274) y PD-L2. A diferencia de los ligandos de CTLA-4, PD-L1 se expresa selectivamente en diversos tumores sólidos y microambiente tumoral¹⁴⁶. Más recientemente se han publicado diversos estudios con los inhibidores de este receptor (anti-PD-1) nivolumab (*BMS936558*, *MDX-1106*) y lambrolizumab (*MK-3475*), y de su ligando PD-L1 el anticuerpo *BMS936559*¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ que han mostrado tasas de respuesta del 28%¹⁴⁸, 52%¹⁴⁹ y 6-29%¹⁴⁶ respectivamente. La supervivencia libre de enfermedad ha sido de entre 1.9-24 meses¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ con efectos secundarios grado 3-4 en el 14% de los pacientes

y notificaciones de fallecimiento por toxicidad pulmonar¹⁴⁸. Faltan estudios comparativos pero la toxicidad por estos fármacos parece ser menos frecuente y de menor gravedad que la producida por el tratamiento con ipilimumab¹⁴⁶. El fármaco nivolumab se encuentra aprobado por la EMA desde junio del 2015 para el tratamiento del melanoma metastásico. La combinación de anti-CTLA-4 con anti-PD1 se postula además como una nueva línea de tratamiento en melanoma y otros tumores sólidos¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

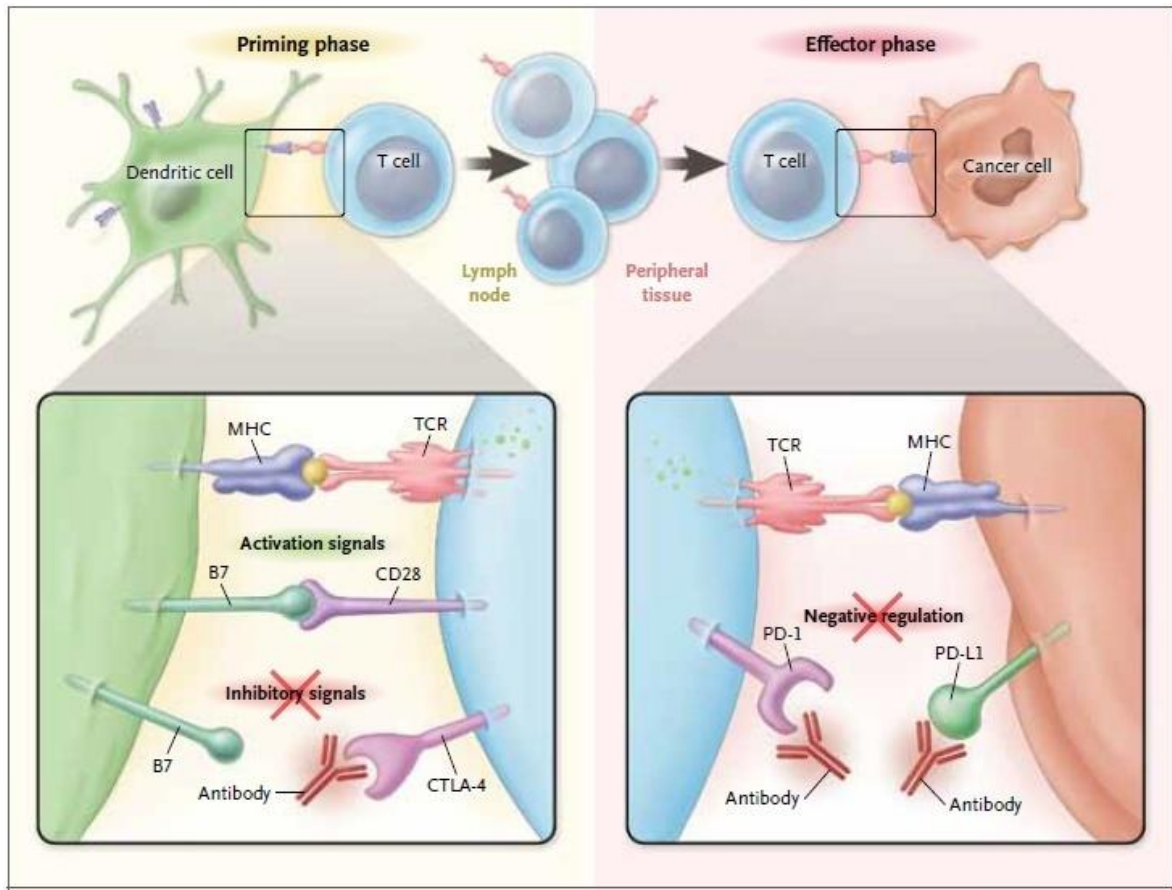


Fig.9.- Bloqueo de la señalización de PD-1 o CTLA-4 en la inmunoterapia tumoral. Tomado de: Ribas A. *Tumor immunotherapy directed at PD-1. NEJM. 2012; 366(26):2517-9.*

La aparición de tratamientos dirigidos frente a alteraciones genéticas específicas tumorales ha obtenido grandes resultados en el tratamiento de otros tumores. La etapa de las terapias dirigidas en melanoma se inició con la detección de la expresión del receptor de estrógenos. Algunos estudios^{152, 153} mostraron una mayor tasa de respuesta y supervivencia del tratamiento con DTIC más tamoxifeno frente a sólo DTIC en mujeres. Posteriores investigaciones cuestionaron estos resultados y actualmente el tamoxifeno no se utiliza ya en el tratamiento del melanoma avanzado.

Sorafenib fue el primer agente dirigido frente a BRAF que fue estudiado en el melanoma metastásico¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Se trata de un inhibidor de los RTKs (VEGFR, PDGFR, c-Kit) cuyo espectro de actuación abarca también a BRAF y CRAF aunque de forma menos potente¹⁵⁷. Se considera, por tanto, un inhibidor no selectivo de BRAF al que también se atribuye una capacidad antiangiogénica. Aunque en los ensayos en fase I y II mostró actividad frente a melanoma, los ensayos de fase III evidenciaron ausencia de significación en todos los objetivos finales del ensayo^{156, 158}. En modelos animales con xenoinjertos de melanoma, los inhibidores de BRAF mostraron una regresión tumoral, mientras que sorafenib sólo mostró estabilización tumoral¹⁵⁹. Este fármaco, desarrollado inicialmente para el tratamiento del cáncer de pulmón, actualmente se encuentra aprobado para el tratamiento del carcinoma renal y el hepatocarcinoma, pero no es por el momento útil en monoterapia ni en combinación para el tratamiento del melanoma metastásico.

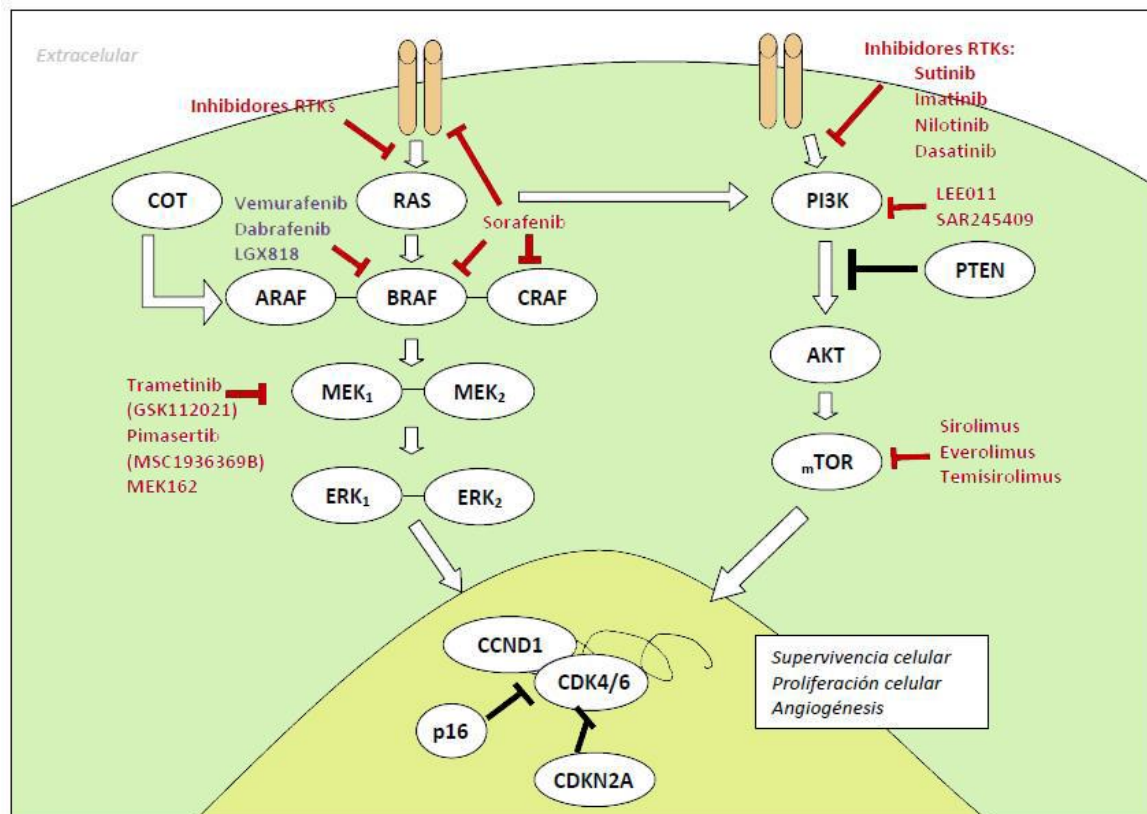


Fig.10.- Tratamientos dirigidos en melanoma.

Los inhibidores selectivos de BRAF abrieron una nueva perspectiva en 2011 en el tratamiento del melanoma metastásico. Hablaremos de ellos más adelante, pero baste decir que supusieron un incremento muy significativo en las tasas de respuesta (superiores al 50% en los pacientes portadores de mutación en BRAF) con impacto en la supervivencia libre de progresión. Se trataba además de tratamientos por primera vez muy bien tolerados y de administración oral.

Siguiendo con el interés despertado en los tratamientos dirigidos a la alteración de la vía de las MAPK, en 2012 el inhibidor de MEK llamado trametinib mostró superioridad frente a la quimioterapia convencional. En pacientes portadores de la mutación BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K}, la supervivencia libre de progresión fue de 4.8 meses (HR 0.45; IC 95% 0.33-0.63 p<0.001) frente a 1.5 meses en pacientes tratados con quimioterapia¹⁶⁰. La supervivencia global a los 6 meses era del 81% en el grupo de trametinib frente al 67% en el grupo de la quimioterapia. Los efectos secundarios más frecuentes fueron afectación cutánea, diarrea y edema periférico. Posteriores estudios han mostrado también respuesta en pacientes no portadores de la mutación¹⁶¹. Estudios más recientes evidencian que la combinación de trametinib con inhibidores de BRAF¹⁶² tendría una mayor tasa de respuesta y supervivencia libre de progresión, así como menos efectos secundarios.

	VÍA	POSOLOGÍA	TR	SG	Toxicidad	Estado
DTIC	IV	1000mg/m ² iv c.3 semanas un total de 3 ciclos. Pueden repetirse hasta 6 ciclos.	7-21%	4.6-7.8m	Elevada	Aprobado
IL-2	IV	600.000-720.000 IU/kg iv c.8h 14 dosis consecutivas en 5 d. Nuevo ciclo igual tras 6-9 d de descanso. Pueden repetirse c.6-12 semanas.	16% (6% RC)	17.8m (+gp100)	Muy elevada (valorar realizar en UCI)	Aprobado (FDA pero no EMEA)
Ipilimumab	IV	3 mg/kg cada 3 semanas iv un total de 4 ciclos. Mantenimiento cada 3m.	5.8-11%	10.2-11.4 m	Elevada	Aprobado
Nivolumab	IV	0.1-10 mg/kg cada 2 semanas iv. Hasta 12 ciclos.	28-32%	19-24 m	Moderada	En estudio
Vemurafenib	Oral	960mg (4cp) cada 12h hasta progresión / toxicidad.	52.3%	15.9 m	Baja	Aprobado
Dabrafenib	Oral	150mg (2-3 cp) cada 12h hasta progresión / toxicidad.	54% (70% con MEKi)	7.6 m	Baja	Aprobado
Trametinib	Oral	2mg (1cp) cada 24h hasta progresión / toxicidad.	22%	4.9 m (SLP)	Baja	En estudio
Imatinib	Oral	400mg (8cp) cada 12-24h hasta progresión / toxicidad.	16-29%	11.5 m	Moderada	En estudio

Tabla.4.- Alternativas terapéuticas actuales para el melanoma metastásico. SLP = supervivencia libre de progresión; SG = supervivencia global; RC = respuesta completa. Los estudios para trametinib en monoterapia no disponen de datos de supervivencia global.

Existen también otras terapias dirigidas que han mostrado utilidad, como el imatinib. Se trata de un inhibidor de RTKs, incluyendo c-Kit y PDGFR, que ha sido ampliamente utilizado en leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, tumor gastrointestinal estromal (GIST) y dermatofibrosarcoma protuberans. Como hemos visto previamente, un bajo porcentaje de los melanomas (3%)¹⁰³ son portadores de mutaciones en KIT. En aquellos melanomas portadores de esta mutación, imatinib ha mostrado una respuesta en el 16-29% de los tumores, con una supervivencia global de 11.5 meses^{163, 164}. Actualmente nuevos estudios con otros inhibidores tirosin-kinasa como sunitinib¹⁶⁵ y nilotinib¹⁶⁶, para melanomas portadores de mutaciones en KIT, están siendo llevados a cabo.

Los tratamientos dirigidos frente a mutaciones específicas se han posicionado como el tratamiento de primera línea para los pacientes con melanoma metastásico portadores de la mutación. La utilización de inmunoterapias como ipilimumab o anti-PD-1 se postula, en cambio, como una buena opción terapéutica para aquellos pacientes que no sean portadores de mutaciones específicas o como segunda línea en aquellos que presenten resistencia frente a las terapias dirigidas.

5.2. INHIBIDORES DE BRAF EN EL TRATAMIENTO DEL MELANOMA AVANZADO

La introducción de los inhibidores selectivos de BRAF (BRAFi)¹⁶⁷ supuso un hito en el tratamiento del melanoma avanzado. A diferencia de los resultados obtenidos previamente con el inhibidor no selectivo sorafenib, los inhibidores selectivos sí mostraron utilidad en el tratamiento del melanoma metastásico, tanto en monoterapia como en terapia combinada.

En el estudio en fase I del inhibidor de BRAF Vemurafenib (VM) o PLX4032 con dosis escaladas, se objetivó una tasa de respuesta del 81% en aquellos pacientes con melanomas portadores de la mutación BRAF^{V600E} con 2 dosis orales de 960mg cada 12horas³. Posteriormente se llevó a cabo el estudio abierto, internacional y multicéntrico de fase II BRIM-2^{168, 169}, cuyo objetivo era valorar la tasa de respuesta, duración de la respuesta así como supervivencia global. El estudio estaba constituido por un único grupo de tratamiento con VM (n=132) integrado por pacientes en estadio IIIc o IV con positividad para BRAF^{V600} que hubiesen recibido tratamiento previo. El tratamiento con VM redujo el tamaño del tumor (tasa de respuesta) en el 52.3% de los participantes (95% CI: 43–61%; 2.3% CR, 50% PR); la duración media de la respuesta fue 6.8 meses (95% CI: 5.6-NA), la de supervivencia libre de enfermedad 6.2 meses (95% CI: 5.6–6.8%) con una supervivencia global de 15.9 meses. Se mostró, por tanto, que los inhibidores de BRAF eran activos en pacientes que hubiesen recibido otros tratamientos previamente.

En el estudio BRIM-3^{167, 170}, un ensayo clínico de fase III internacional y multicéntrico, aleatorizado, abierto y controlado, se comparaba VM con DTIC (n= 675) en pacientes con melanoma en estadio IIIc o IV, BRAF^{V600E} y no tratados previamente. Las variables principales de valoración en el estudio eran la SG y la SLP. La tasa de respuesta confirmada (reducción del tamaño del tumor) en el grupo de VM fue del 48,4% (respuesta completa: 1%, respuesta parcial: 47.4%) frente al 5.5% (respuestas parciales) en el de DTIC (p <0.0001). La mediana de la SLP era de 6.9 meses en el grupo de VM frente a 1.6 meses en el de DTIC, HR 0.38 (IC 95%: 0.32-0.46; p<0.001)¹⁷⁰. La mediana de la supervivencia global fue de 12.5 meses en los pacientes tratados con VM frente a 9.5 meses en los tratados con DTIC, con una HR de 0.70 (95% IC: 0.57- 0.87; p=0.0008)¹⁷⁰. La ventaja en la supervivencia global de VM sobre DTIC pudo verse infraestimada, dado que casi la mitad de los pacientes inicialmente asignados al brazo de DTIC recibieron posteriormente VM en segunda línea. Las respuestas objetivadas en los estudios incluyeron lesiones metastásicas de localización ganglionar linfática, pulmonar, ósea, hepática, intestino delgado³. Posteriores estudios mostraron además efectividad en metástasis cerebrales^{171, 172}

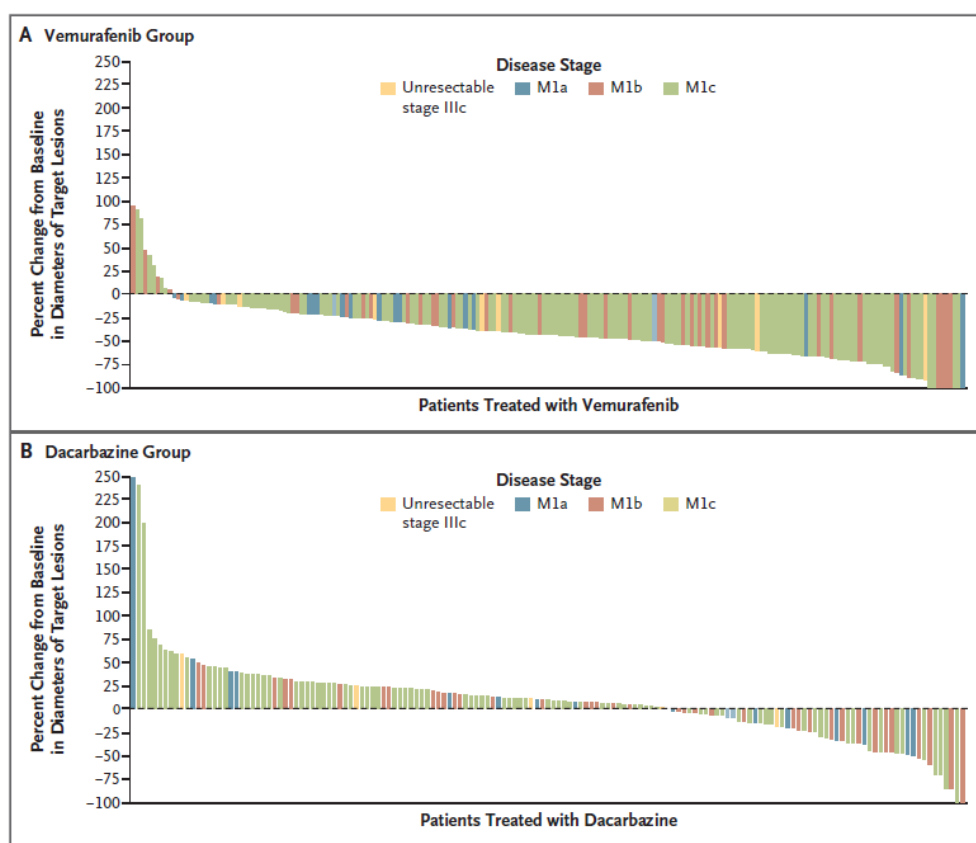


Fig.11.- Tasas de respuesta en el estudio BRIM-3 de VM y DTIC. Cada uno de los pacientes se encuentra identificado por una barra, cada color se corresponde con el estadio de los pacientes. En el panel A se muestran los pacientes tratados con VM (n=209) y en el panel B el grupo de DTIC (n=158). Obtenida de Chapman et al.¹⁶⁷

El tratamiento con VM presenta además la ventaja adicional de ser un medicamento de administración oral. Esta característica minimiza el impacto en la calidad de vida del paciente y los costes derivados de su administración, aumentando también la adherencia al tratamiento.

Los resultados de otro inhibidor oral de BRAF llamado dabrafenib (GSK2118436) han mostrado unas tasas de respuesta y supervivencia libre de progresión similares¹⁷³⁻¹⁷⁵. Tanto dabrafenib como vemurafenib han mostrado también actividad frente a melanomas portadores de la mutación BRAF^{V600K} 61, 169, 170, 176, 177 (aunque con tasas de respuesta más bajas) y BRAF^{V600R} 171, 178, 179. En estos pacientes también se ha mostrado efectivo el inhibidor de MEK trametinib^{160, 180}.

A pesar de estos avances, la mayor parte de los pacientes en tratamiento con BRAFi presentan progresión de la enfermedad en 6-7 meses desde el inicio del tratamiento^{167, 169, 181}. El desarrollo de resistencias adquiridas a dichos tratamientos se ha atribuido a distintos mecanismos:

- Reactivación de la vía MAPK mediada por la kinasa COT (*cáncer Osaka thyroid kinase*)¹⁸²
- Aparición de mutaciones de *novo* en NRAS o MEK o activación de CRAF¹⁸³⁻¹⁸⁸
- Dimerización o *splicing* alternativo del gen que condicionan una variante truncada de la proteína BRAF¹⁸⁹ que puede activar la vía de las MAPK.
- Señales independientes que medien la activación de la MAPK a través de los RTKs^{183, 190}
- Activación paralela de la vía PI3K iniciada por alteraciones genéticas en sus componentes (Ej. pérdida de función de PTEN) o iniciada por el insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R)¹⁹¹

La hipótesis de que parte de las resistencias adquiridas a BRAFi podría deberse a la reactivación de la vía de las MAPK de forma alternativa, planteó la utilización en combinación con inhibidores de MEK 1/2 (BRIM-7) y anti-CTLA-4. Un estudio reciente¹⁶² mostró que, la combinación de dabrafenib y trametinib en pacientes con melanoma metastásico portadores de la mutación BRAF^{V600} (n=247), presentaba mejores resultados frente a dabrafenib en monoterapia con menos efectos secundarios. La mediana de SLP fue de 9.4 meses (IC 95% 8.6-16.7) frente a 5.8 meses (4.6-7.4). Las tasas de respuesta fueron del 76% frente al 54% en monoterapia. La utilización de dicha terapia combinada en adyuvancia se encuentra también en estudio.

La combinación de BRAFi con otros tratamientos se encuentra en desarrollo. Algunos estudios sugieren que el tratamiento previo con BRAFi podría hacer a las células portadoras de esta mutación más radiosensibles¹⁹², ampliando así la utilidad de la radioterapia en el tratamiento del melanoma avanzado¹⁹³. Su utilización en adyuvancia en melanomas en estadios IIIB y IIIC (BRIM-8)

tras la cirugía está siendo estudiada. Del mismo modo se ha mostrado que los BRAFi estimulan la antigenicidad del melanoma, haciéndolo más vulnerable a la inmunoterapia¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Los primeros estudios de combinación de VM con ipilimumab han mostrado una elevada hepatotoxicidad¹⁹⁷, que podría verse explicada por la activación de células hepáticas BRAF^{WT}¹⁹⁸. El tratamiento secuencial con ipilimumab y posteriormente VM ha evidenciado casos de toxicidad cutánea grave¹⁹⁹. Actualmente se encuentran en desarrollo distintos estudios de tratamientos combinados con BRAFi como son: Ipilimumab y VM (NCT01400451), VM seguido de ipilimumab (NCT01673854), ipilimumab con/sin dabrafenib y/o trametinib (NCT01940809), VM y adesleukin (NCT01754376), VM con interferón e IL-2 (NCT01603212), VM con interferón alfa-2b a altas dosis (NCT01943422), VM con anti PD-L1 (NCT01656642) y VM con inhibidores de c-Kit (NCT01826448)¹⁹⁸.

El tratamiento secuencial se ha postulado también como un buen esquema terapéutico, dado que ambos grupos terapéuticos tienen diferentes pero potencialmente complementarios mecanismos de acción. Este hecho se vería además favorecido por la capacidad de la terapia dirigida de sensibilizar las células tumorales a los ataques inmunitarios¹⁹⁸. Algunos autores señalan a los BRAFi como el tratamiento más adecuado en aquellos pacientes portadores de mutación en BRAF con enfermedad sintomática, con elevada masa tumoral, rápidamente progresiva, LDH elevada o metástasis cerebrales²⁰⁰⁻²⁰². Por el momento ningún ensayo clínico aleatorizado ha evidenciado cuál sería el orden terapéutico idóneo de los fármacos, habiéndose incluso propuesto la posibilidad de realizar tratamientos de inducción con BRAFi y, tras estabilizar la enfermedad, continuar con inmunoterapia.²⁰²

Considerando el beneficio clínico y el aumento en la supervivencia global, los inhibidores de BRAF son en la actualidad según todas las guías clínicas el tratamiento de elección en pacientes con melanoma avanzado portador de la mutación BRAF⁶². Vemurafenib se encuentra aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico con mutación BRAF^{V600} desde agosto del 2011 y por la EMEA desde febrero del 2012, publicándose finalmente el informe de posicionamiento terapéutico en España en noviembre 2013. Más recientemente dabrafenib ha sido aprobado en mayo del 2013 por la FDA, en junio 2014 por la EMEA y en mayo 2015 por la AEMPS.

5.3. RESISTENCIAS Y EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS INHIBIDORES DE BRAF

Se han descrito distintos efectos secundarios del tratamiento con inhibidores de BRAF. Estos efectos son fundamentalmente cutáneos, de baja intensidad y bien tolerados. Los efectos secundarios más frecuentemente descritos con los inhibidores de BRAF^{167, 173, 174, 203-207} son:

- Fotosensibilidad.
- Desarrollo de queratoacantomas, carcinomas epidermoides y verrugas vulgares.
- Pirexia.
- Fatiga y artralgias.
- Alteración de las encimas hepáticas, nausea y diarrea.
- Otra toxicidad cutánea como foliculitis, prurito, erupción tipo queratosis pilar, hiperqueratosis y eritrodisestesia de palmas y plantas, paniculitis, erupciones acneiformes, alopecia, lesiones disqueratóticas, alteración de lesiones melanocíticas y exantemas.
- Otros efectos: parálisis facial transitoria uni o bilateral^{169, 208, 209}

Efectos secundarios (grado 2)	Vemurafenib ¹	Dabrafenib ²	Trametinib ³
Fotosensibilidad	12	3	NR
QAcs / CECs	8/12	6 (combinados)	NR
Fatiga	13	NR	27
Artralgia	21	5	NR
Cefalea	5	5	NR
Exantemas	18	NR	27
Hiperqueratosis	6	13	NR
Hipertensión	NR	NR	12

Tabla.5.-Efectos secundarios (%) más frecuentes en los tratamientos dirigidos para el melanoma metastásico. QAcs: queratoacantomas; CEC: carcinoma epidermoide; NR: no referido. Chapman PB, et al.¹; Hauschild A, et al.²; Flaherty KT, et al.³

La fotosensibilidad en estos pacientes ha mostrado ser dependiente de UVA (no así UVB) en varios estudios mediante irradiación UV en pacientes tratados con vemurafenib^{210, 211}. Dicha sensibilidad se veía reducida o suprimida con la utilización de fotoprotectores con cobertura de amplio espectro UVA. Esta sensibilidad parece ser más frecuente en pacientes tratados con vemurafenib (12-30%) mientras que la pirexia lo es en aquellos tratados con dabrafenib (24%)²¹².

El desarrollo de queratoacantomas y carcinomas epidermoides cutáneos (CECs) ya había sido descrito previamente en pacientes tratados con sorafenib^{213, 214} y más recientemente con suramina²¹⁵, indicando un mecanismo etiopatogénico común. Dicho efecto no se observa en el tratamiento con otros inhibidores multikinasa, como sunitinib, que no afectan a la kinasa RAF. En pacientes tratados con inhibidores de BRAF, estas lesiones pueden aparecer desde las dos semanas de tratamiento. Se estima una tasa de aparición en torno a un 18-30%, son por tanto uno de los efectos secundarios más frecuentes²¹⁶. Los CECs desarrollados en estos pacientes, a diferencia de las lesiones no inducidas por inhibidores de BRAF, muestran un aspecto clínico e histopatológico similar al queratoacantoma. Tienen un patrón crateriforme bien diferenciado pero también asocian nidos de invasión dérmica. Pueden aparecer en zonas no fotoexpuestas²¹⁶ y se han referido con más frecuencia en pacientes de edad avanzada²⁰⁵.



Fig.12.-Efectos secundarios cutáneos de los BRAFi. Verrugas vulgares (A), queratoacantomas (B), fotosensibilidad (C), paniculitis (D).

En relación al mecanismo etiopatogénico de estos tumores, se cree que los inhibidores de BRAF podrían producir una hiperactivación paradójica de la vía de las MAPK en células BRAF^{WT}. Dicha activación estaría condicionada por la existencia de una activación asociada de RAS, por una mutación o por activación en niveles superiores de la vía como EGFR^{22, 217-220}. La proteína mutada BRAF^{V600E} preferentemente se homodimeriza y el tratamiento con inhibidores de BRAF inhibiría esta homodimerización. Según un primer modelo la presencia de la mutación en RAS condicionaría una tendencia de BRAF a la heterodimerización con CRAF, de forma que la

inhibición de BRAF (la mitad del heterodímero) transactivaría CRAF activando la vía de las MAPK²¹⁹. Según un segundo modelo la presencia de la mutación en RAS haría que la señalización en la vía fuese preferentemente por CRAF permaneciendo BRAF en el citosol; al unirse al inhibidor BRAF sería reclutada a la membrana y produciría la transactivación de CRAF aumentando la señalización en la vía²²⁰. En ambos modelos CRAF parece ser la clave en la activación paradójica, habiéndose además demostrado una elevada frecuencia de mutaciones en RAS en estos tumores (hasta un 60%), siendo HRAS la más frecuente²²¹.

Por otro lado, a pesar de los signos histológicos sugestivos de infección por el virus del papiloma humano (HPV), todos los estudios de detección de HPV se han mostrado negativos aunque p16 ha mostrado una expresión elevada en los CECs^{205, 207}. No se han reportado metástasis de estos carcinomas en ninguno de los pacientes²¹⁶ y se consideran lesiones con fácil tratamiento quirúrgico o métodos destructivos (crioterapia, electrocuretaje o terapia fotodinámica)^{222, 223}.

La aparición de exantemas medicamentosos ha sido descrita en una baja proporción de los pacientes tratados (7-8%)^{167, 169} y con una baja gravedad, a excepción de un caso descrito con necrolisis epidérmica tóxica²²⁴. Dichas reacciones parecen ser de mayor intensidad y frecuencia en aquellos pacientes que han recibido tratamiento con ipilimumab en las 4 semanas previas al inicio de los inhibidores de BRAF^{199, 225-227}. La toxicidad cutánea aparece de forma precoz, principalmente durante el primer mes de tratamiento. Del mismo modo, la hepatotoxicidad parece ser más frecuente en aquellos pacientes tratados con inmunoterapia junto con inhibidores de BRAF¹⁹⁷, aunque es reversible discontinuando el tratamiento o administrando corticoides sistémicos.

Se ha referido un aumento en la incidencia de lesiones melanocíticas atípicas y en regresión en pacientes tratados con inhibidores de BRAF²²⁸. También un riesgo aumentado de segundo melanoma^{167, 168, 228-231}. En 10 pacientes de 462 tratados en los ensayos en fase 2 y 3^{167, 168} se describió la aparición de un segundo melanoma cutáneo durante el tratamiento. Posteriores publicaciones han evidenciado también ese fenómeno^{228, 229}. Todos los casos se trataban de melanomas superficiales, no siendo ningún caso melanomas agresivos o metastásicos²³⁰, si bien es cierto que eran pacientes que se mantenían en control clínico y dermatoscópico estrecho. Por el momento no se dispone de una incidencia real de la aparición de un segundo melanoma en estos pacientes²³². La aparición de dichas alteraciones parece ser un fenómeno precoz tras el inicio del tratamiento y se trata de lesiones carentes de la mutación BRAF^{V600}(BRAF^{WT})²³⁰. Se postula como etiología una hiperactivación de CRAF que daría lugar a una estimulación paradójica

de la vía RAF-MEK-ERK tal y como se ha demostrado en estudios *in vitro*²¹⁸. En cualquier caso la incidencia de dichos melanomas no excede la esperada en una población de riesgo como son los pacientes con antecedente personal de melanoma²³², por lo que futuros estudios serán necesarios en este campo para discernir si los inhibidores tienen una relación de causalidad con estas nuevas lesiones. La recomendación es un control estricto de las lesiones pigmentadas en los pacientes tratados con estos inhibidores.

La combinación de inhibidores de BRAF con inhibidores de MEK parece no sólo aumentar la eficacia del tratamiento, sino también disminuir los efectos secundarios cutáneos^{162, 233}. La incidencia de CECs se ve reducida en el tratamiento combinado (7%) frente a la monoterapia (19%). Dicha combinación ha mostrado por otro lado una mayor incidencia de pirexia¹⁶².

La resistencia a los inhibidores de BRAF ha cobrado una gran importancia en recientes estudios, debido a la precoz recaída de muchos pacientes durante el tratamiento. Se han postulado distintos mecanismos^{22, 62}:

- a) La reactivación de ERK por un mecanismo alternativo: activación de los RTKs, mutaciones en NRAS o MEK, transactivación de CRAF o activación de COT.
- b) Activación paralela de PI3K mediante la pérdida de PTEN o la estimulación del IGF-1R
- c) Formación de variantes truncadas de la proteína BRAF por un splicing alternativo del gen, con capacidad de activación de la vía de las MAPK.

Los resultados prometedores de combinaciones terapéuticas como los BRAFi con MEKi avalarían estas hipótesis de vías alternativas de activación. Un mayor conocimiento de estas vías así como los mecanismos de actuación de las terapias dirigidas resulta fundamental en estos pacientes, para anticiparnos al desarrollo de efectos secundarios así como prevenir la aparición de resistencias al tratamiento.

6. CORRELACIÓN MUTACIONAL ENTRE TUMOR PRIMARIO Y METÁSTASIS: ANTECEDENTES.

La concordancia mutacional entre el tumor primario y sus metástasis ha sido ya estudiada en otros tumores malignos. La mayor parte de los estudios muestran una elevada concordancia: HER-2 en cáncer de esófago (85% de concordancia)²³⁴, BRAF en cáncer de colon (98-100% de concordancia)²³⁵⁻²³⁸ y KRAS en cáncer de colon (92-100% concordancia)^{235, 236, 239-247}. Aunque algunos autores han reflejado una tasa de discordancia nada despreciable entre el tumor primario y las metástasis: HER-2 en cáncer de esófago (hasta un 22'5% de discordancia)²⁴⁸ y KRAS en cáncer de colon (hasta un 32'4%)^{238, 249}.

En melanoma son pocos los estudios que analizan la correlación mutacional entre la lesión primaria y sus metástasis. Los resultados son heterogéneos encontrando algunos autores una elevada concordancia^{39, 250} mientras que otros muestran tasas alrededor del 50%²⁵¹⁻²⁵³. La mayor parte de estos estudios (a excepción del realizado por Colombino y cols) se basan en un tamaño muestral bajo que no permite obtener conclusiones válidas.

7. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN BRAF

Existen distintos métodos que permiten la detección de las mutaciones en BRAF. La elección de uno u otro método se ve justificada tanto por su facilidad y rapidez de realización, su sensibilidad y especificidad así como por su coste. La determinación de mutaciones en tejido tumoral se puede realizar mediante diferentes técnicas moleculares, pero aquellas utilizadas de forma rutinaria en los laboratorios de anatomía patológica pueden dividirse en dos grandes grupos: la amplificación con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de una técnica de secuenciación y los métodos basados en la PCR a tiempo real (RT-qPCR).

La secuenciación de Sanger y la pirosecuenciación son los métodos para determinar el estado mutacional utilizados más ampliamente. Durante años la secuenciación de Sanger de DNA previamente amplificado mediante la PCR se ha considerado el método de referencia para la detección de mutaciones adquiridas en tumores y para la secuenciación del genoma humano. Se trata de una técnica que permite detectar sustituciones de bases, deleciones e inserciones, aunque no alteraciones en las copias cromosómicas o traslocaciones⁶³. Este tipo de secuenciación precisa de un tiempo elevado para su realización (18-19h), un equipo específico no siempre disponible en muchos laboratorios y un personal cualificado para la lectura de los resultados.

Posee una alta especificidad pero su mayor limitación es que posee una baja sensibilidad (92.5%²⁵⁴) lo cual obliga a disponer de una carga tumoral de hasta un 5% en las muestras a analizar⁶³. Su tasa superior de falsos negativos condiciona un mayor riesgo de que pacientes portadores de la mutación no sean tratados con los BRAFi. Actualmente no se recomienda realizar esta técnica para la detección de pacientes candidatos al tratamiento con BRAFi²⁵⁴.

La pirosecuenciación, también conocida como secuenciación por síntesis, se basa en la liberación de pirofosfato por la DNA polimerasa al añadir nucleótidos de forma complementaria a la cadena de DNAs. Para su realización se realiza una amplificación del DNA mediante PCR, se hibrida la cadena de DNAs con un *primer* y finalmente se incuba con las enzimas. Posteriormente se añaden y lavan secuencialmente soluciones con los nucleótidos A, C, G y T. El pirofosfato liberado con la incorporación de un nucleótido se acopla a las enzimas ATP sulfurilasa y luciferasa para generar luz detectable mediante una reacción de quimioluminiscencia. La liberación de luz producida es detectada cada vez que una base es añadida y la señal queda registrada como un pico en un gráfico llamado pirograma (fig.13). La intensidad de la luz representada por la altura de dicho pico, determinará si hay más de un nucleótido repetido^{255, 256}. Esta técnica permite detectar no sólo la presencia o ausencia de mutación, sino también el porcentaje de DNA que porta la mutación. La pirosecuenciación ha mostrado una sensibilidad muy superior a la secuenciación de Sanger⁶³, detectando no sólo la mutación BRAF^{V600E} sino también otras mutaciones menos frecuentes como V600K, V600D, V600R, K601E^{63, 254}. Se trata de una técnica rápida (<24h) pero que, con frecuencia, produce errores en secuencias con un mismo nucleótido repetido 6-7 veces (homopolímeros). A diferencia de la secuenciación de Sanger que permite detectar longitudes de 800-1000 nucleótidos, esta técnica permite sólo detectar 300-500 nucleótidos. La mayor desventaja es el coste elevado de los reactantes y la necesidad de un equipo específico, no siempre disponible en los laboratorios convencionales de Anatomía Patológica.

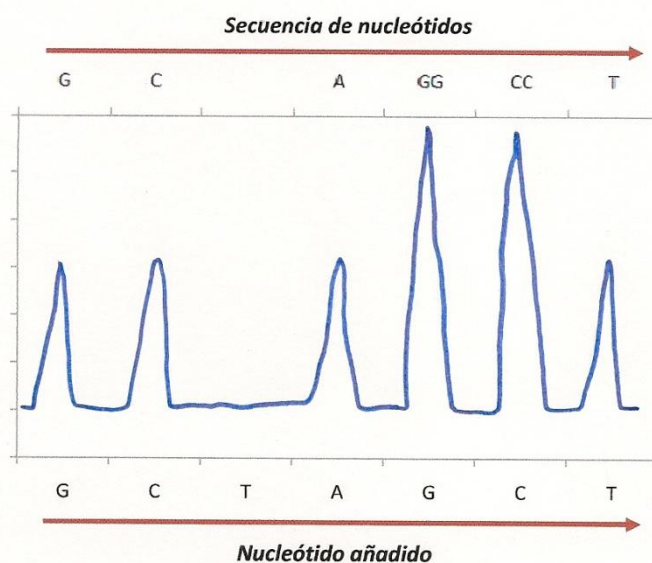


Fig.13.- Ejemplo de un pirograma.

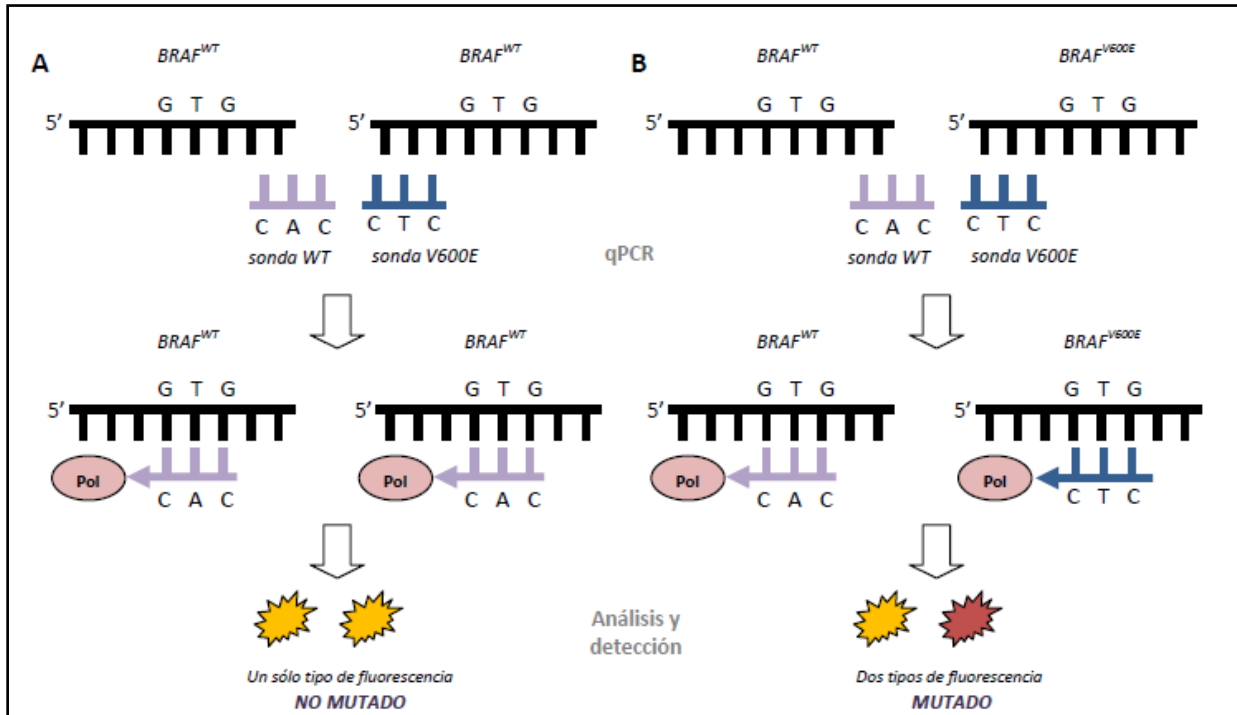


Fig.14.- Técnica de la plataforma Cobas® 4800 BRAF V600. A. Estudio de DNA tumoral sin mutación BRAF^{V600E} mostrando como la unión con la sonda no mutada (sonda WT) emite una fluorescencia única que es interpretada como “NO MUTADO”. B. Estudio de DNA tumoral con mutación BRAF^{V600E} mostrando como la unión con ambas sondas emiten dos tipos de fluorescencia que son interpretadas como “MUTADO”. Adaptado de Curry et al⁶³.

Las pruebas diagnósticas basadas en RT-qPCR se han convertido en el método más utilizado en los laboratorios para la detección de mutaciones en tejido tumoral. Se trata de una técnica más rápida (<8 horas) y con sensibilidad superior a la secuenciación de Sanger, de hasta un 97.5%^{66, 254, 257}. La técnica in vitro se basa en el uso de un termociclador incorporando un lector de fluorescencia. El objetivo es la detección mediante fluorescencia de la mutación presente en DNA extraído de muestras tisulares fijadas en formalina y embebidas en parafina. En el caso de la mutación en el protooncogén BRAF, el estudio se dirige hacia una secuencia específica en el exón 15. El resultado nos permite conocer la presencia o ausencia de mutación. Se trata por tanto de una técnica rápida y económica, que permite analizar lotes de 3 muestras sin reducción del rendimiento del reactivo y la utilización de dispositivos ya presentes en el laboratorio para la detección de otras mutaciones solicitadas en la práctica clínica diaria (como KRAS en cáncer de colon o EGFR en carcinoma de pulmón no microcítico).

Actualmente se encuentran aprobados varios dispositivos para la realización de PCR a tiempo real, de entre los que destacan:

- *Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche Molecular Systems)*: aprobado en 2011 para pacientes candidatos a tratamiento con vemurafenib por la Food and Drug Administration (FDA) y tiene el sello de conformidad europeo (CE).
- *THxID™ BRAF Kit (bioMérieux Inc)*: aprobado en 2013 por la FDA para pacientes candidatos a tratamiento con dabrafenib con/sin trametinib.



Fig.15.- Kit y plataforma *Cobas®* instalada en nuestro laboratorio.

La utilidad clínica del test *Cobas®* ha sido validada en los estudios BRIM2 y BRIM3 para la identificación de tumores portadores de la mutación $BRAF^{V600E}$ (100% de las muestras detectadas²⁵⁸), mostrándose también de utilidad para la determinación de las mutaciones $BRAF^{V600K}$ (70% de las muestras detectadas²⁵⁸), $BRAF^{V600D}$ y $BRAF^{V600E2}$ 212, 257. El límite inferior de detección de la mutación con la plataforma *Cobas®* es de 4.4% alelos mutados por 1.25ng/ μ L. En el caso de mutaciones como la V600K y V600E2 se requiere porcentajes más elevados (31% y 68% respectivamente)⁶³. Los errores objetivados con esta técnica frecuentemente se deben al pigmento melánico, considerado un inhibidor de la PCR.

Yancovitz y cols²⁵³ determinaron la presencia de la mutación $BRAF^{V600E}$ con esta técnica en 112 muestras de melanoma hallando una positividad en el 75.9% (66.7% primarios y 77.7%

metástasis) frente a la obtenida mediante secuenciación convencional en las mismas muestras del 32.1% de los casos (38.9% primarios y 30.9% metástasis). En estos casos además, no hallaron ningún tumor mutado que fuese detectado por la secuenciación pero no por la PCR a tiempo real.


HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA					
cobas® 4800					
BRAF V600 Mutation Analysis Report					
Start of Run:	13-Jan-2012 11:17:14	DNA Isolation Kit ID #1:	AD1P145471C0015		
Instrument Name:	50603	Reagent Kit ID #1:	9A1P13183AC0024		
Instrument Serial No:	50603_30163	Reagent Lot / Exp Date:	P13183 / Nov-2012		
Core Version:	2.0.0.1028	Operator:	c4800		
BRAF AP Version:	1.0.0.1028				
RUN STATUS VALID					
RUN NAME: 13-JAN-2012 11:17 BRAF					
Controls					
Position	Control Type	Kit#	Control Status	Flags	Accepted By
A01	Mutant Control	1	Valid		c4800
B01	Wildtype Control	1	Valid		c4800
Specimens					
Position	Sample ID	Kit#	Test Result	Flags	Accepted By
F01	D-08-156	1	Mutation Detected		c4800

Fig.16.- Informe de la plataforma Cobas® indicando la presencia de la mutación BRAF^{V600}.

En el caso de las muestras citológicas obtenidas por punción, algunos autores²⁵⁹ han mostrado también la utilidad del método Cobas® para su estudio. Se ha hallado una concordancia del 93% con respecto a la secuenciación en 117 muestras parafinadas y citológicas, conteniendo estas últimas al menos un 50% de células tumorales.

Recientemente se han desarrollado un anticuerpo monoclonal frente a la proteína mutada BRAF^{V600E} (VE1)²⁶⁰⁻²⁶². Este anticuerpo permite la detección de la mutación mediante técnicas inmunohistoquímicas en muestras parafinadas de los tumores. La técnica ha mostrado una sensibilidad de hasta el 100%²⁵⁴ en la detección de la mutación BRAF^{V600E}, aunque no permite detectar otras mutaciones incluyendo la BRAF^{V600K}. Dado que la inmunohistoquímica es una técnica rápida y económica utilizada rutinariamente en el laboratorio anatomopatológico hospitalario, su aplicación se muestra como una herramienta rápida y eficiente para la práctica clínica diaria. El problema es que se trata de un método no aprobado por el momento por la FDA o la EMEA para la detección de la mutación en pacientes candidatos a tratamiento con BRAFi. Por otro lado, teniendo en cuenta que los BRAFi se han mostrado eficaces en el tratamiento de tumores con la mutación BRAF^{V600K}, la utilización de la inmunohistoquímica como técnica de detección exclusivamente impediría que los pacientes con dicha mutación se beneficiasen del tratamiento. Parece razonable por tanto la utilización combinada de técnicas como la inmunohistoquímica con técnicas moleculares como la PCR a tiempo real o la pirosecuenciación.

Para la realización de nuestro estudio se decidió utilizar la técnica de la PCR a tiempo real ya que, en comparación con la secuenciación de Sanger, esta prueba tiene ventajas significativas. Es más sensible y fiable para detectar mutaciones^{66, 257} y los resultados son más rápidos (<8 horas). El precio por determinación es más económico con el kit que se utiliza en la plataforma *Cobas*[®] y además la empresa que lo distribuye llegó a un acuerdo con nuestro departamento y con el Hospital Clínico de Salamanca para ceder la plataforma sin coste adicional. Durante la realización del estudio, era un requisito imprescindible en pacientes candidatos a tratamiento con vemurafenib que la determinación del estado mutacional de BRAF hubiese sido realizada con la plataforma *Cobas*[®]. El test *Cobas*[®], por tanto, permite no sólo utilizar estas determinaciones para proyectos de investigación sino también para su aplicación clínica. Dado que alguno de los pacientes incluidos en el estudio podía beneficiarse en un futuro de dicho tratamiento, éste fue también un factor determinante para la selección de dicho método.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La utilización de inhibidores de BRAF como tratamiento del melanoma metastásico se ha realizado hasta ahora mediante la detección de la mutación en la lesión primaria. Esta premisa asume la concordancia del estado mutacional de los tumores metastásicos con el de las lesiones primarias que los generan. Por otro lado, a diferencia de otros tumores malignos, la disponibilidad del tejido metastásico en el melanoma es mayor pues con frecuencia produce lesiones fácilmente accesibles para la extirpación quirúrgica o punción diagnóstica. Administrar una terapia dirigida frente a una mutación no presente en las lesiones metastásicas, supone un gasto económico innecesario y un retraso en la administración de tratamientos más efectivos. En contraposición, no administrar dichos inhibidores a un paciente que sí presentase la mutación en las lesiones metastásicas pero no en el tumor primario, reduciría su supervivencia y sus opciones terapéuticas de por sí ya escasas en nuestro medio. Nuestro estudio pretende identificar la muestra más adecuada para el estudio del estado mutacional, así como el grado de concordancia o discordancia entre el tumor primario y sus metástasis.

Este estudio tiene además como objeto mostrar las características clínico-patológicas más frecuentemente asociadas con la presencia de la mutación BRAFV600E en una población representativa de pacientes con melanoma de Castilla y León. Conocer las características asociadas a los melanomas portadores de la mutación, permitiría prever aquellos pacientes que podrían ser candidatos a terapia dirigida. Del mismo modo, dado que el estudio se ha realizado antes de la introducción de los tratamientos inhibidores de BRAF en nuestro medio, permite valorar la implicación pronóstica de la mutación.

2. HIPÓTESIS

Los tumores portadores de la mutación BRAF^{V600E} podrían mostrar características clínicas y anatomopatológicas asociadas, que permitirían predecir la presencia de la mutación en la lesión primaria o las metástasis. Así mismo, la presencia de la mutación BRAF^{V600E} podría tener una implicación pronóstica que motivase la realización tratamiento adyuvante en estos pacientes y su inclusión como parámetro pronóstico en la clasificación TNM.

Por otro lado, las alteraciones moleculares presentes en el tumor primario podrían ser discordantes con las halladas en sus correspondientes metástasis debido a la heterogeneidad intratumoral. Es por ello fundamental establecer el tejido tumoral más adecuado para la

determinación del estado mutacional. Valorar la discordancia entre los tumores primarios y sus metástasis nos permitiría establecer un protocolo de para la realización del estudio de la mutación BRAF^{V600E}.

3. OBJETIVOS

- 1) Analizar la frecuencia de la mutación BRAF^{V600E} en melanoma empleando tejido parafinado tanto de tumores primarios como de metástasis ganglionares linfáticas, cutáneas y hematógenas de pacientes de Castilla y León.
- 2) Establecer la relación entre el estado mutacional de BRAF en melanomas con variables clínicas.
- 3) Establecer la relación entre el estado mutacional de BRAF en melanomas con las variables histopatológicas de las lesiones primarias y las metastásicas.
- 4) Establecer la relación entre el estado mutacional de BRAF en melanomas y la supervivencia del paciente. Valor de la mutación como factor pronóstico.
- 5) Establecer la relación entre el estado mutacional de BRAF de los tumores primarios y sus correspondientes metástasis.
- 6) Determinar las bases para futuros protocolos de identificación de mutaciones de BRAF en material parafinado de melanoma, estableciendo la idoneidad de la determinación en el tejido tumoral primario o metastásico.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realiza un estudio descriptivo de carácter retrospectivo de todos los pacientes con diagnóstico de melanoma invasivo sometidos a estudio ganglionar (biopsia selectiva del ganglio centinela o linfadenectomía) en el Servicio de Dermatología del Hospital Clínico de Salamanca (Complejo Asistencial de Salamanca) entre los años 1995-2012.

2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Un total de 204 pacientes fueron seleccionados. De esta muestra inicial sólo en 153 casos se disponía del tejido tumoral primario y se obtuvo una cantidad suficiente de DNA para el estudio mutacional. Uno de los casos fue excluido tras obtener de forma repetida un error tanto en el estudio del tejido primario como de la metástasis. Se obtuvieron un total de 152 muestras de melanoma primario invasivo y 70 de tejido metastásico (originadas por 59 tumores primarios). Las muestras de tejido metastásico incluían metástasis ganglionares (n=51), en partes blandas (n=15) y hematógenas (n=4).

2.1. Criterios de selección y descripción de la muestra

Se seleccionaron muestras tisulares fijadas en formalina y embebidas en parafina de pacientes con melanomas primarios invasivos que hubiesen sido sometidos a la técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela o linfadenectomía, así como de sus correspondientes metástasis. Dichas muestras se obtuvieron de los archivos anatomopatológicos del Servicio de Dermatología y Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Salamanca (Complejo Asistencial de Salamanca).

Dado que el Hospital Clínico de Salamanca se trata del centro de referencia para la técnica del ganglio centinela en melanoma, se solicitaron las muestras tisulares de los tumores primarios correspondientes a los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales Virgen de la Concha de Zamora, Nuestra Señora de Sonsoles de Ávila y Complejo Asistencial de Palencia.

En colaboración con el Dr. Santos-Briz, patólogo responsable del área de Dermatopatología de dicho hospital, se revisó el material comprobando el diagnóstico anatomopatológico previamente a su inclusión en el estudio. Se desestimaron un total de 52 muestras por diagnóstico anatomopatológico dudoso o erróneo o por falta de disponibilidad de tejido tumoral para la determinación de la mutación. Ninguno de los clínicos participantes en el estudio conocían los resultados del estudio mutacional previamente a la recogida de los datos.

2.2. Procesado de las muestras tisulares

Todas las preparaciones embebidas en parafina de tumores primarios y lesiones metastásicas fueron procesadas y teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) en el Hospital Clínico de Salamanca para su estudio anatomopatológico. Las muestras ganglionares fijadas en formol se procesaron según el protocolo de múltiples secciones²⁶³ con cortes de 2-3 mm de grosor embebidos por separado en parafina, realizando al menos 7 secciones consecutivas al micrótopo de cada bloque. Se tiñeron las secciones con H-E y en el caso de las metástasis se realizaron tinciones inmunohistoquímicas adicionales con S100 y el cóctel de melanoma que incluía HMB-45, MART-1 y tirosinasa (Biocare Medical, Concord, CA, USA). En ningún caso se trataba de muestras citológicas.

3. VARIABLES RECOGIDAS

3.1. Variables clínicas

Se recogieron datos epidemiológicos y clínicos retrospectivamente revisando las historias clínicas de los pacientes, tanto las disponibles en el Complejo Asistencial de Salamanca como las de los centros que los habían referido. Se recabó la información correspondiente a un total de 37 variables clínicas:

- Fecha de nacimiento.
- Provincia de procedencia.
- Sexo del paciente.
- Edad del paciente al diagnóstico.
- Inmunodepresión.
- Antecedente de diabetes.
- Antecedente de vitíligo.
- Fototipo, color de ojos y color del cabello.
- Raza.
- Antecedentes personales y familiares de melanoma.
- Antecedentes personales y familiares tanto de cáncer de piel no melanoma como de otro tipo de neoplasias.
- Antecedentes personales o presencia de múltiples nevos
- Antecedentes o presencia de nevos displásicos.
- Antecedentes de quemaduras solares.

- Utilización de cabinas de rayos UVA.
- Subtipo clínico de melanoma⁹⁶.
- Ulceración clínica.
- Regresión clínica.
- Tamaño tumoral.
- Patrón de exposición solar.
- Asociación con lesión preexistente.
- Localización de la lesión primaria.
- Localización y tipo de metástasis.
- Estadío AJCC.
- Fecha de diagnóstico, fecha de progresión y fecha de defunción.
- Tiempo de seguimiento hasta la aparición de metástasis.
- Tiempo de seguimiento total.
- Tratamientos recibidos.
- Causa de defunción.

El objetivo de recoger los tiempos de seguimiento era la determinación de la:

- Supervivencia global: definida por los meses de supervivencia desde el diagnóstico hasta la fecha de fallecimiento o hasta el 31 de diciembre del 2013.
- Supervivencia libre de progresión: definida por el tiempo transcurrido desde el diagnóstico, durante y después del tratamiento, en el que el cáncer no crece ni se disemina aún más.

3.2. Variables anatomopatológicas

Las muestras de melanoma primario cutáneo se clasificaron siguiendo la clasificación de la OMS en: melanoma de extensión superficial (MES) con 97 muestras, melanoma nodular (MN) con 30 muestras, melanoma lentiginoso acral (MLA) con 18 muestras y léntigo maligno melanoma (LMM) con 2 muestras. Las lesiones no clasificables en esas categorías (melanoma spitzoide y melanoma desmoplásico) se les asignó el término “no clasificable” (NC) con 5 muestras.

Se revisaron todas las muestras tisulares recogiendo un total de 30 variables. Además del subtipo histológico se recogieron las siguientes variables anatomopatológicas:

- Grosor tumoral: Se midió el grosor tumoral en milímetros, siguiendo los parámetros del índice de Breslow²⁶⁴ que toman la medida desde el borde externo de la capa granulosa (o base de la úlcera) hasta la zona más profunda de la infiltración neoplásica.
- Nivel de Clark: definido por el grado de invasión de la epidermis (nivel I), dermis papilar sin alcanzar la interfase papilar-reticular (nivel II), dermis papilar en su totalidad (nivel III), dermis reticular (nivel IV) y tejido celular subcutáneo (nivel V)²⁶⁵
- Fase de crecimiento: clasificada como radial en aquellos tumores en una fase precoz en que el melanoma se expande horizontalmente sobre la superficie de la piel y vertical en aquellas lesiones con crecimiento infiltrante en profundidad con grandes nidos dérmicos (más de 15 células) o con mitosis.
- Ulceración: definida como la ausencia de capa epidérmica en todo su grosor adyacente al tumor, con evidencia de respuesta dérmica en forma de inflamación o fibrina así como adelgazamiento, borramiento o hiperplasia reactiva de la epidermis circundante²⁶⁶. Variable expresada en forma dicotómica.
- Melanoma poliploide: patrón de crecimiento exofítico estando conectado a la piel por un pedículo
- Melanoma pagetoide: infiltración de las distintas capas de la epidermis, generalmente de forma más intensa en capas bajas, que recuerda al patrón de la enfermedad de Paget.
- Celularidad predominante: la morfología de las células tumorales valorada en la porción más celular de la lesión utilizando una lente de 20x. Se subclasificaron en los tipos: fusocelular, epitelioides, spitzoides/nevóides, globoides, plasmocitoides y pleomórfico.
- Atipia citológica: definida por la anormalidad tanto en la forma como el tamaño celular, graduándose en ausente, moderada o intensa.
- Elastosis actínica: degeneración de las fibras elásticas definida por la presencia de depósitos basofílicos homogéneos o fibrilares en la dermis reticular. Recogido en una variable dicotómica.
- Pigmentación de los melanocitos: definida como la acumulación de melanina en los melanocitos, valorándose en una escala como ausente (amelanótico), débil (hipomelanótico), moderada e intensa. Posteriormente se recodificó en presencia o ausencia de pigmentación. No se consideraron los melanófagos en la valoración de esta variable.
- Epidermotropismo: referido de forma dicotómica como presente o ausente y definido como la presencia de melanocitos intraepidérmicos aislados o formando nidos.

- Consumición epidérmica: variable dicotómica definida por la presencia o ausencia de adelgazamiento epidérmico con atenuación de las capas basales y suprabasales, y pérdida de las crestas interpapilares adyacentes a los melanocitos.
- Necrosis y descohesión celular: variable dicotómica definida por la presencia de celularidad con citoplasma hipereosinófilico con alteraciones nucleares (picnosis, cariorrexis o cariólisis).
- Micronódulos: variable dicotómica definida por el crecimiento infiltrante de la neoplasia en forma de pequeños nidos celulares.
- Presencia de satelitosis microscópicas: variable dicotómica definida por nidos de células de melanoma separadas por colágeno o grasa del tumor principal por una distancia igual o superior a 0.5 mm.
- Mitosis: Número de mitosis dérmicas por milímetro cuadrado y presencia o ausencia de mitosis atípicas. Se empleó el método del “hot spot” que establece que el número de mitosis debe ser valorado en el área donde mayor número de figuras mitóticas se observe⁹⁵.
- Invasión angiolinfática: variable dicotómica definida por la detección de células tumorales en el interior de la luz (intravascular) o alrededor (perivascular) de estructuras vasculares peritumorales.
- Invasión perineural: presencia de células neoplásicas en el espacio perineural (neurotropismo) reflejado en una variable dicotómica.
- Infiltrado inflamatorio: variable dicotómica expresando la presencia o ausencia del infiltrado. Se recogieron también variables especificando la localización intratumoral o peritumoral, y la celularidad que lo componía.
- Regresión histológica: variable dicotómica reflejando la existencia de regresión tumoral con desaparición de parte de la masa tumoral y/o fibrosis en sustitución de células neoplásicas. Se especificó también en variables adicionales la extensión de esta (focal o extensa) y el tipo (temprana o tardía).
- Nevus asociado: presencia de restos de tecas de células névicas benignas en el interior o contigüidad con el melanoma expresado en forma de variable dicotómica. Además se recogió en una variable adicional el patrón adquirido o congénito.

En el caso del estudio ganglionar las variables recogidas fueron:

- *Número de ganglios afectados.*
- *Tipo de metástasis:* según la localización de la celularidad metastásica clasificada en subcapsular, subcapsular e intraparenquimatosa, intraparenquimatosa o metástasis masiva.
- *Tamaño tumoral y número de células metastásicas.*
- *Extensión extracapsular* de la metástasis.
- Presencia de *necrosis* focal o extensa en la metástasis.

4. ESTUDIO MUTACIONAL DE BRAF

La determinación del estado mutacional se realizó en el laboratorio de dermatopatología del Hospital Clínico de Salamanca. Un total de 222 muestras tumorales procedentes de 150 pacientes fueron analizadas, presentando en dos casos el mismo paciente dos melanomas primarios. Fueron estudiados por tanto 152 tumores primarios y 70 metástasis.

Se obtuvieron 4 secciones de cada una de las muestras tumorales embebidas en parafina. La primera sección fue teñida mediante H-E para el control histológico. Con el resto de secciones se realizó la macrodissección, seleccionándose las áreas con mayor densidad de células neoplásicas mediante marcaje con microscopía óptica por un patólogo experto.

La extracción de DNA se llevó a cabo, siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el *Cobas® DNA sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)*. El estado mutacional se determinó mediante *Cobas® 4800 BRAF V600E Mutation Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)*. El test Cobas® es un método molecular basado en la extracción de DNA y la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) del exón 15 del gen BRAF ubicado en el cromosoma 7q34². La mutación BRAF^{V600E} (1799 T>A) ha sido descrita previamente en la *Human Gene Mutation Database* y en el *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC). Los resultados fueron clasificados como mutado o no mutado (*wild-type*) según la presencia o ausencia de la mutación BRAF^{V600E} respectivamente.

Aquellos casos que presentaban discordancia mutacional entre el tejido tumoral y la metástasis, en los que se disponía de material tumoral suficiente, fueron enviados a un centro de referencia (Servicio de Anatomía Patológica - Hospital 12 de Octubre en Madrid) para su estudio mediante secuenciación Sanger e inmunohistoquímica con anticuerpo anti-BRAF^{V600E} VE1 (*Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos recogidos fueron almacenados en una base de datos utilizando la herramienta informática SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL). La base de datos contenía 73 campos y 152 registros. Esta misma aplicación informática se utilizó para el estudio estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas e histopatológicas. Para las variables cuantitativas se calcularon medias y desviaciones típicas o medianas y cuartiles. Para las variables cualitativas según su distribución de frecuencias. Con el objeto de mostrar la presencia o ausencia de una asociación estadísticamente significativa con la presencia de la mutación BRAF^{V600} se realizó estudio comparativo tanto con la variable mutación en el tumor primario como con la variable mutación en la metástasis. Esta variable se obtuvo del resultado del estudio mutacional de todas las metástasis, aquellos casos que presentaban varias metástasis discordantes entre sí fueron excluidos del análisis.

Mediante el test Chi-cuadrado de Pearson se analizó la asociación de las variables cualitativas. En los casos en los que el número de celdas con valores esperados menores de 5 era mayor de un 20%, se utilizó el test exacto de Fisher o el test Razón de verosimilitud para variables con más de dos categorías. Las comparaciones de los valores cuantitativos se realizó mediante la prueba T de Student para dos muestras independientes o la prueba no paramétrica U de Mann Whitney según el caso.

Se realizó un análisis de regresión logística multivariante para determinar la presencia de mutación incluyendo aquellas variables que resultaron ser estadísticamente significativas a nivel 0,1 en los análisis previos univariantes. El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan Meier, presentando además las curvas de supervivencia tanto para la presencia de la mutación en el tumor primario como en la metástasis.

En todos los análisis realizados, aquellos resultados con valor de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS.

1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

1.1. Variables clínicas

1.1.1. Hospital de procedencia

De los 150 pacientes (152 muestras primarias), 100 casos procedían del Hospital Clínico Universitario de Salamanca (65.8%), 33 del Hospital Nuestra Señora de Sonsoles de Ávila (21.7%), 13 del Complejo Asistencial de Palencia (8.6%) y 6 del Hospital Virgen de la Concha de Zamora (3.9%).

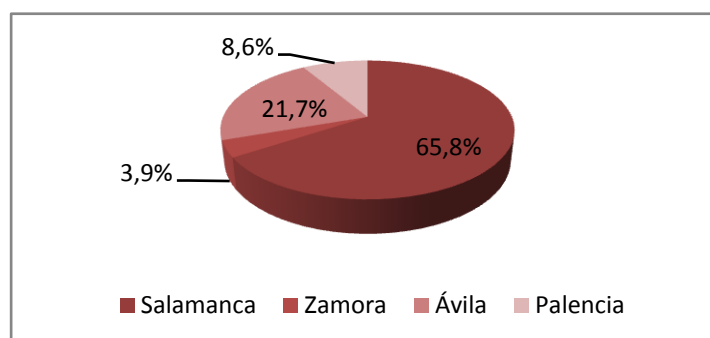


Fig.17.- Distribución de los casos según el hospital de procedencia. Hospital Clínico Universitario (Salamanca); Hospital Virgen de la Concha (Zamora); Hospital Nuestra Señora de Sonsoles (Ávila); Complejo Asistencial de Palencia (Palencia).

1.1.2. Sexo

La distribución de los pacientes por sexos mostró ser similar entre mujeres (55.3%) y hombres (44.7%).

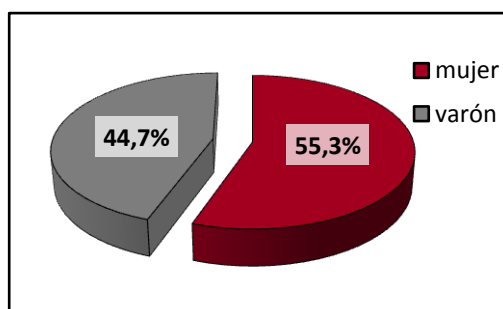


Fig.18.- Distribución por sexo de la muestra.

1.1.3. Edad

La edad media al diagnóstico de los pacientes era de un intervalo entre los 17 y 85 años, con una media de 58.7 años, una mediana de 62 años y una desviación típica de 14.69. La distribución por edades queda reflejada en el siguiente gráfico:

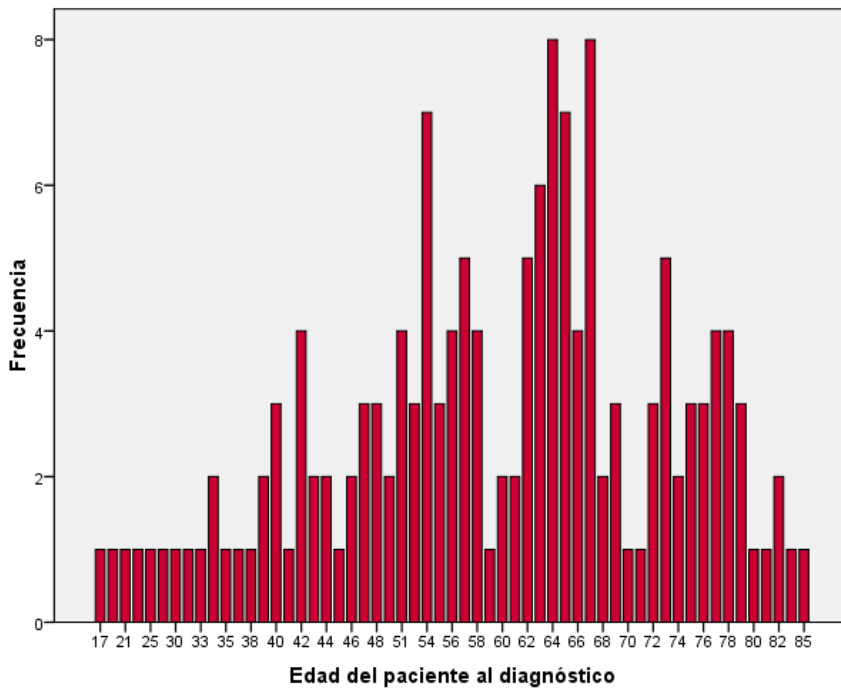


Fig.19.- Distribución de las edades de los pacientes de la muestra.

1.1.4. Fototipo y raza

La distribución por fototipos mostró una mayor presencia de fototipos bajos II (57.5%) y III (37.9%) frente a los más elevados IV (4.6%), con un claro predominio de raza caucásica (99.2%).

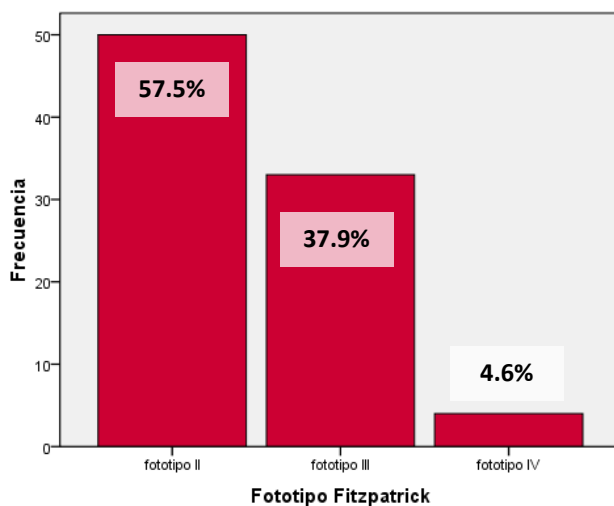


Fig.20.- Distribución por fototipo de la muestra.

1.1.5. Localización

Las localizaciones más frecuentes de la lesiones primarias fueron en el tronco (29.6%) y en las extremidades (36.2%).

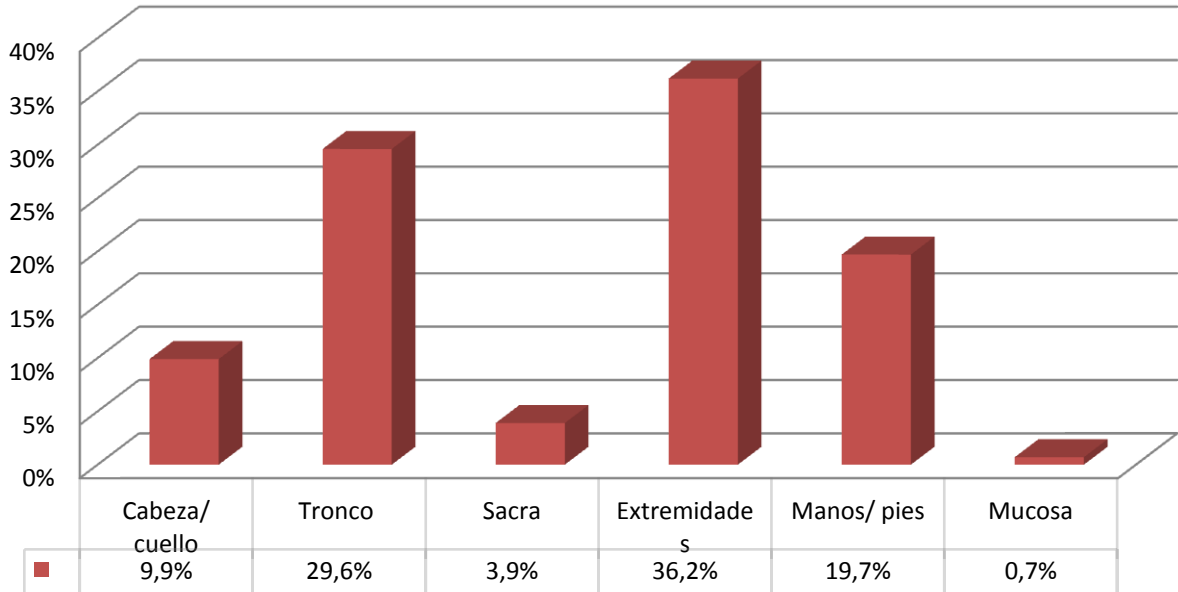


Fig.21.- Localización de la lesión primaria en la muestra.

1.1.6. Patrón exposición solar

El patrón de exposición solar más frecuente fue el patrón intermitente (60.5%), seguido del patrón acral (19.7%), crónica (17.8%) y finalmente el menos frecuente el compuesto por lesiones en zonas mucosas y no expuestas como la zona perineal (2%).

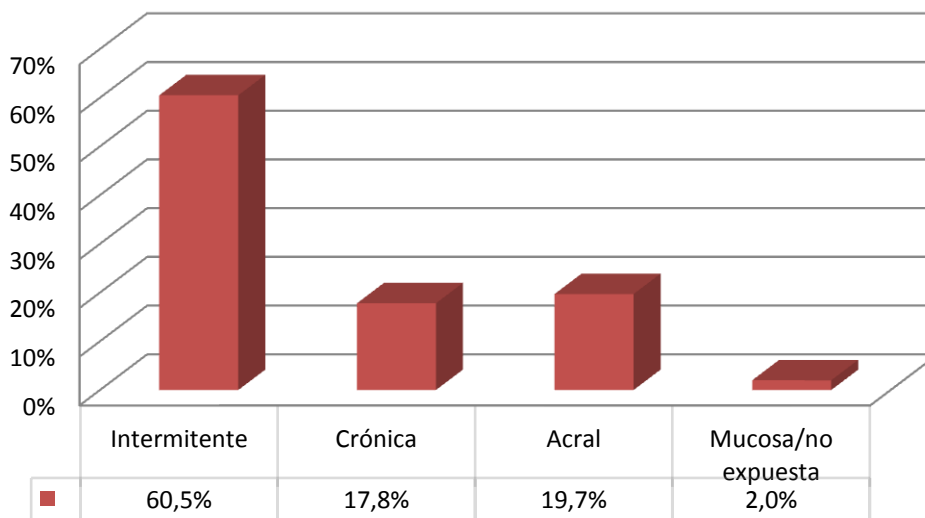


Fig.22.- Patrón de exposición solar de la lesión primaria en la muestra.

1.1.7. Otras variables

Ningún paciente refirió antecedentes de exposición a cabinas de rayos UVA aunque hasta un 82.6% había sufrido quemaduras solares en la infancia (Fig.23). Un 11.2% presentaba más de 20 nevus comunes, mientras que en un 9% de los casos presentaban nevus displásicos (4.5% diagnosticados como “síndrome del nevus displásico”)

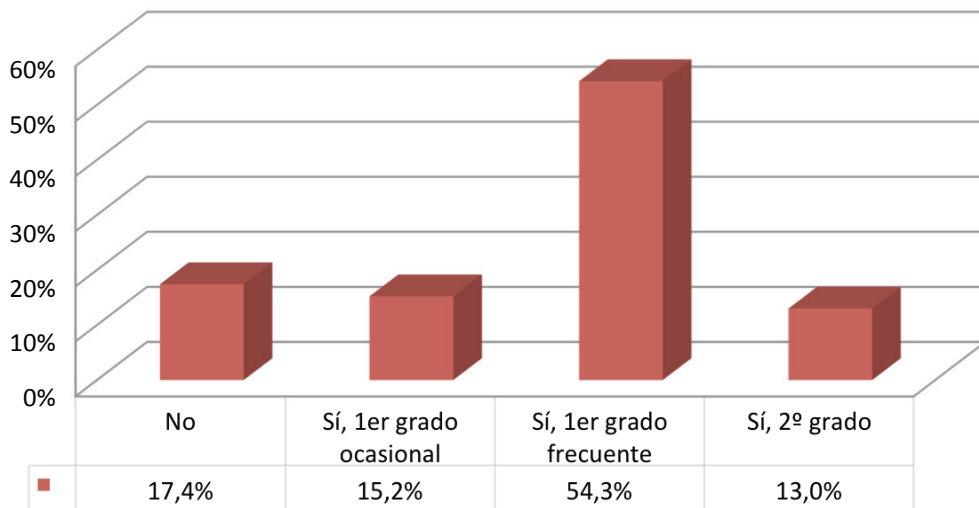


Fig.23.- Frecuencia de quemaduras solares en la infancia de la muestra.

Respecto a los antecedentes neoplásicos personales, sólo ocho casos (5.3%) tenían antecedentes de melanoma. Aunque un 7.9% de los pacientes estaban diagnosticados de carcinoma basocelular, en ningún caso presentaban antecedentes de carcinoma epidermoide o cáncer de páncreas. Otras neoplasias como el adenocarcinoma de colon (2%), carcinoma mamario (2%) o hematológicas (3.3%) mostraron una menor frecuencia (Fig.24). En los antecedentes familiares, ocho pacientes (5.3%) presentaban historia de melanoma, sin hallar en ningún caso familiares con cáncer de páncreas. La mayor parte de los pacientes no presentaban ningún antecedente familiar de neoplasia (67.7%), aunque entre los que sí lo presentaban el cáncer de mama (8.6%), colon (5.4%) y pulmón (5.4%) se encontraban entre los más frecuentes (Fig.25).

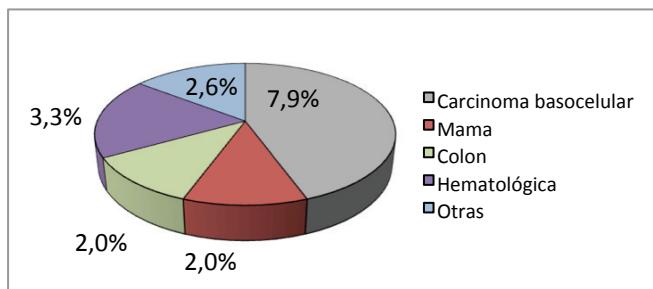


Fig.24.- Antecedentes personales de otra neoplasia. No quedan reflejados en la gráfica aquellos pacientes sin antecedentes de neoplasias.

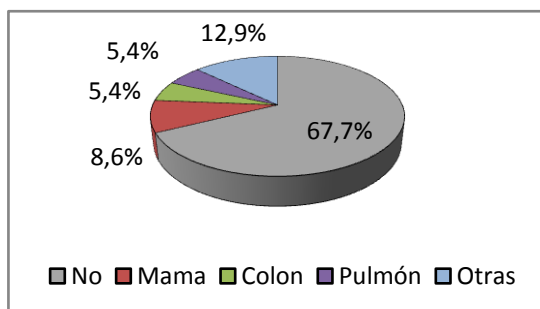


Fig.25.- Antecedentes familiares de otra neoplasia.

Otros posibles factores como el vitíligo y la inmunodepresión estaban presente en 2 (1.3%) y 9 (6%) pacientes respectivamente. La diabetes se objetivó en un 9.9% de los pacientes. En el caso de los pacientes con vitíligo sólo uno había fallecido a causa del melanoma.

<i>Variables clínicas</i>	<i>N (%)</i>
Hospital de procedencia	
Salamanca	100 (65.8%)
Ávila	33 (21.7%)
Palencia	13 (8.6%)
Zamora	6 (3.9%)
Sexo	
Hombre	68 (44.7%)
Mujer	84 (55.3%)
Edad	
<50 años	39(25.7%)
≥50 años	113 (74.3%)
Fototipo	
II	50 (57.5%)
III	33 (37.9%)
IV	4 (4.6%)
Raza	
Caucásica	126 (99.2%)
Hispana	1 (0.8%)
Localización	
Tronco	45 (29.6%)
Sacro	6 (3.9%)
Extremidades	55 (36.2%)
Manos y pies	30 (19.7%)
Cabeza y cuello	15 (9.9%)
Mucosa anal	1 (0.7%)
Exposición solar	
Intermitente	92 (60.5%)
Crónica	27 (17.8%)
Acral	30 (19.7%)
Mucosas/no expuesta	3 (2%)
Exposición cabina UVA	
Sí	0 (0%)
No	120 (100%)

<i>Variables clínicas</i>	<i>N (%)</i>
Quemaduras solares infancia	
Sí	38 (82.6%)
No	8 (17.4%)
Múltiples nevus (n>20)	
Sí	15 (11.2%)
No	119 (88.8%)
Nevus displásicos	
Sí	12 (9%)
No	122 (91%)
Vitíligo	
Sí	2 (1.3%)
No	149 (98.7%)
Diabetes	
Sí	15 (9.9%)
No	137 (90.1%)
Inmunodepresión	
Sí	9 (6%)
No	141 (94%)
Nevus previo a la lesión	
Sí	61 (41.5%)
No	86 (58.5%)
Ulceración clínica	
Sí	73 (49.3%)
No	75 (50.7%)
Ant.personales melanoma	
Sí	8 (5.3%)
No	144 (94.7%)
Ant.personales otra neoplasia	
Colon	3 (2%)
Mama	3 (2%)
Hematológica	5 (3.3%)
C.Basocelular	12 (7.9%)
Otras	4 (2.6%)
No	124 (82.1%)
Ant. familiares melanoma	
Sí	8 (5.3%)
No	143 (94.7%)
Ant. familiares otra neoplasia	
Colon	5 (5.4%)
Mama	8 (8.6%)
Pulmón	5 (5.4%)
Otras	12 (12.9%)
No	63 (67.7%)

Tabla.6.- Descripción de la muestra: variables clínicas.

1.2. Variables anatomopatológicas

A. Tipo histológico

Considerando las características histológicas de los tumores primarios, el melanoma de extensión superficial fue el subtipo más frecuente (61.8%), seguido del melanoma nodular (21.1%) y el melanoma lentiginoso acral (13.2%). Llamativamente en la muestra la presencia de léntigo melanoma maligno era baja (0.7%) a pesar de la media de edad. Otros tipos como el melanoma spitzoide y desmoplásico estaban presentes en una baja frecuencia (Fig.26).

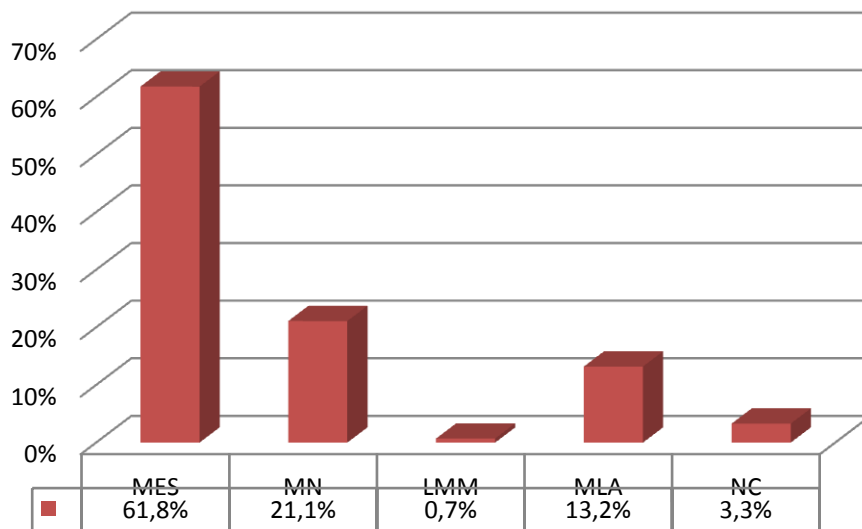


Fig.26.- Frecuencia de los subtipos histológicos de melanoma en la muestra.

MES= melanoma de extensión superficial; LMM= léntigo melanoma maligno; MN= melanoma nodular; MLA= melanoma lentiginoso acral; NC= no clasificable, incluye melanoma spitzoide y melanoma desmoplásico.

B. Ulceración, índice de Breslow y nivel de Clark

El 52% de los tumores presentaban ulceración (52%) (Fig.27). La mediana del índice de Breslow fue de 2.5mm (rango 0.48 a 35 mm). La mayoría de los tumores (96%) presentaban un Clark elevado III-V (Tabla 7).

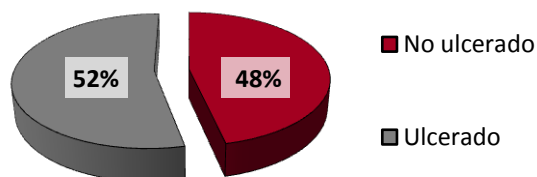


Fig.27.- Frecuencia de ulceración histológica en el tumor primario.

C. Regresión e infiltrado inflamatorio

La regresión histológica estaba presente en un 29.5% de la muestra, siendo fundamentalmente de tipo tardío y extensión focal (Fig.28).

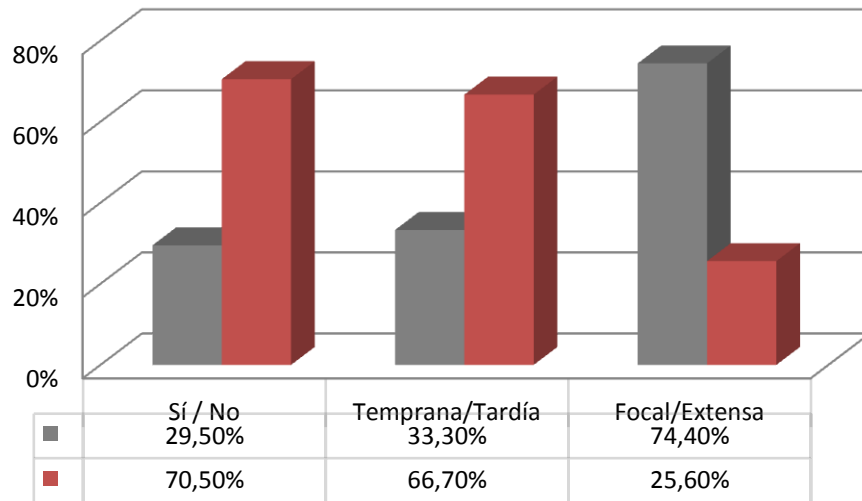


Fig.28.- Frecuencia de regresión histológica en el tumor primario.

Aunque en pocas muestras se objetivó infiltrado inflamatorio intratumoral (24.8%), si hubo una elevada frecuencia de inflamación peritumoral (73.3%) en los tumores primarios. Dicho infiltrado estaba constituido fundamentalmente por células linfocitarias (81.5%) (Fig.29).

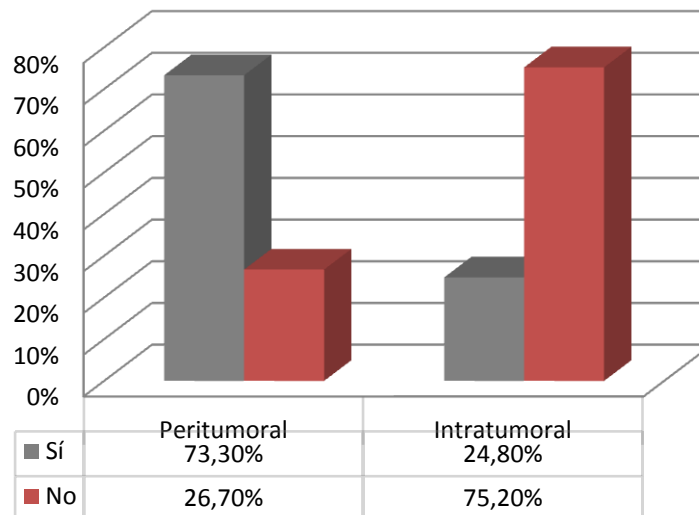


Fig.29.- Frecuencia de infiltrado inflamatorio en el tumor primario.

D. Otras variables anatomopatológicas

Se recabó información de la presencia de otras características histopatológicas como la invasión linfovascular, invasión perivascular, invasión perineural, presencia de nevus asociado, presencia de mitosis y/o mitosis atípicas, extensión pagetoide, melanoma

polipoide, fase de crecimiento, celularidad predominante, elastosis, epidermotropismo, consumición epidérmica, pigmentación, atipia citológica, necrosis, satelitos microscópicas, micronódulos y presencia de discohesión celular. Todas ellas quedan recogidas en la tabla 7.

<i>Variables anatomopatológicas</i>	N (%)
Subtipo	
MES	94(61.8%)
MN	32 (21%)
LMM	1 (0.7%)
MLA	20(13.2%)
Otros	5 (3.3%)
Ulceración	
Sí	77 (52%)
No	71 (48%)
Índice de Breslow	
<0.75 mm	5 (3.3%)
0.75-1 mm	9 (6%)
1.01-2 mm	48 (32.0%)
2.01-4 mm	50 (33.3%)
>4 mm	38 (25.3%)
Clark	
I	0 (0%)
II	6 (4%)
III	34 (22.8%)
IV	87 (58.4%)
V	22 (14.8%)
Regresión	
Sí	43 (29.5%)
No	103 (70.5%)
Tipo de regresión	
Temprana	13 (33.3%)
Tardía	26 (66.7%)
Extensión de regresión	
Focal	29 (74.4%)
Extensa	10 (25.6%)
Infiltrado inflamatorio peritumoral	
Sí	107 (73.3%)
No	39 (26.7%)
Infiltrado inflamatorio intratumoral	
Sí	36 (24.8%)
No	109 (75.2%)
Celularidad inflamatoria	
Linfocitario	88 (81.5%)
Linfoplasmocitario	20 (18.5%)
Invasión linfovascular	
Sí	20(13.8%)
No	125 (86.2%)
Invasión perivascular	
Sí	65 (44.8%)
No	80 (55.2%)

<i>Variables anatomopatológicas</i>	<i>N (%)</i>
Invasión perineural	
Sí	3 (2.1%)
No	139 (97.9%)
Nevus asociado	
Sí	32 (21.9%)
No	114 (78.1%)
Mitosis	
Sí	119 (81.5%)
No	27 (18.5%)
Mitosis atípicas	
Sí	27 (20%)
No	108 (80%)
Pagetoide	
Sí	32 (21.5%)
No	117 (78.5%)
Polipoide	
Sí	72 (50.7%)
No	70 (49.3%)
Fase de crecimiento	
Radial	8 (5.3%)
Vertical	144 (94.7%)
Celularidad	
Epiteliode	58 (38.9%)
Fusocelular	28 (18.8%)
Néfica	47 (31.5%)
Spitzoide	14 (9.4%)
Plasmocitoide	2 (1.3%)
Elastosis	
Sí	35 (24.3%)
No	109 (75.7%)
Epidermotropismo	
Sí	101 (68.2%)
No	47 (31.8%)
Consumición epidérmica	
Sí	87 (59.2%)
No	60 (40.8%)
Pigmentación	
Sí	115 (77.2%)
No	34 (22.8%)
Atipia citológica	
Sí	144 (97.3%)
No	4 (2.7%)
Necrosis	
Sí	11 (7.6%)
No	134 (92.4%)
Satelitosis microscópicas	
Sí	7 (4.9%)
No	137 (95.1%)
Micronódulos	
Sí	24 (16.3%)
No	123 (83.7%)
Discohesión	
Sí	29 (19.7%)
No	118 (80.3%)

Tabla 7.- Descripción de la muestra: variables anatomopatológicas.

E. Metástasis

El estudio de las metástasis ganglionares mostró un elevado porcentaje de metástasis con afectación extensa, siendo un 19% metástasis masivas (>90% del ganglio afecto) y un 39% subcapsulares e intraparenquimatosas. En un bajo porcentaje (16%) las metástasis presentaban extensión extracapsular y tan sólo un 21% presentaban necrosis en su interior.

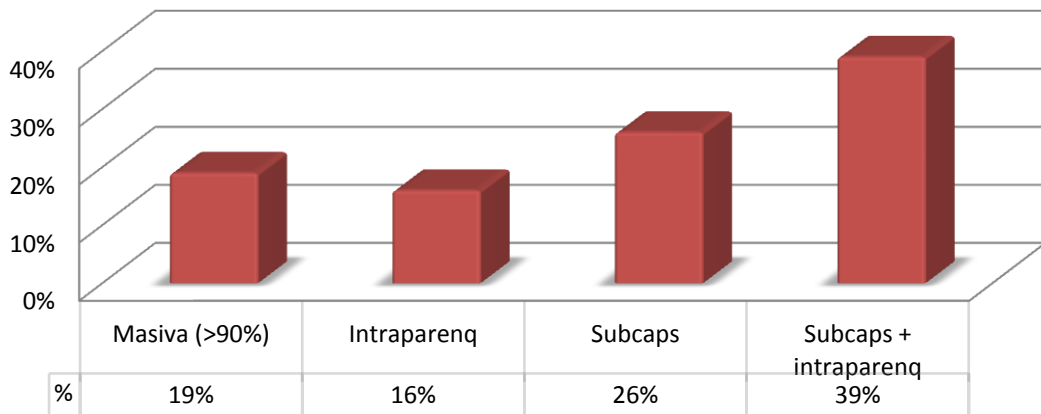


Fig.30.- Tipo histológico de metástasis ganglionares. Intraparenq=intraparenquimatosas; subcaps=subcapsular.

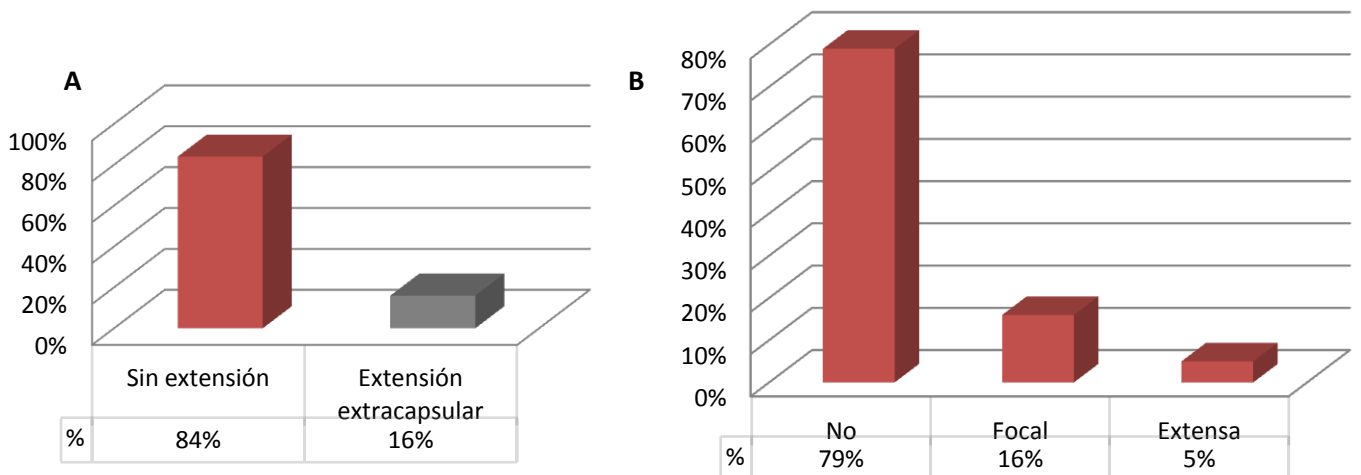


Fig.31.- Extensión extracapsular (A) y necrosis (B) en metástasis ganglionares. La necrosis representada por ausencia y tipo (focal/extensa).

2. RESULTADOS GLOBALES DEL ESTUDIO DE LA MUTACIÓN

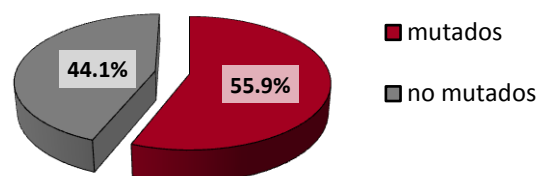
2.1. Frecuencia de la mutación en el tumor primario y las metástasis

Se llevó a cabo el estudio del estado mutacional de BRAF mediante el test Cobas® en 152 tumores primarios procedentes de 150 pacientes. Se obtuvo una elevada frecuencia de la mutación estando presente en más de la mitad de la muestra (55.9%).

El estudio del tejido metastásico mostró la presencia de la mutación en:

- 52.9% de las metástasis ganglionares (n=51)
- 66.7% de las metástasis cutáneas (n=15)
- 50% de las metástasis hematógenas (n=4)

Fig.32.- Frecuencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario.



2.2. Concordancia mutacional entre el tumor primario y las metástasis

En el estudio inicial mediante RT-qPCR se encontraron 13 casos discordantes (12 metástasis ganglionares y 1 en partes blandas). Se trataba en todos los casos de tumores primarios mutados sin hallazgo de mutación en la metástasis. En seis de las 12 metástasis ganglionares que presentaban discordancia mutacional (ausencia de mutación en metástasis ganglionares con el test Cobas®) se disponía de muestra suficiente por lo que fueron estudiados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre mediante técnicas complementarias (tabla 8). Se obtuvieron resultados positivos para la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis mediante secuenciación de Sanger en 4 casos e inmunohistoquímica en 6 casos. Todas las muestras presentaban un bajo porcentaje de tejido tumoral en las metástasis ($\leq 5\%$ en 4 casos y 10% en 2 casos) y en ningún caso se obtuvo por secuenciación mutaciones distintas de la V600E. La discordancia finalmente fue de 6 casos en metástasis ganglionares y 1 caso en metástasis en partes blandas, aunque todos los casos discordantes se trataban de muestras que no habían podido ser estudiadas mediante técnicas complementarias (secuenciación o inmunohistoquímica) por falta de disponibilidad de muestra tisular suficiente.

Casos	Tipo	Primario	Metástasis ganglionar			%
			Cobas®	Sanger	VE1	
1	MES	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	5%
2	MES	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	<5%
3	MES	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	<5%
4	MES	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	<5%
5	MES	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	10%
6	MN	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	10%

Tabla.8.-Metástasis ganglionares cuya mutación fue estudiada mediante otras técnicas. Test Cobas®, secuenciación de Sanger e inmunohistoquímica anti-BRAF^{V600E} (VE1), especificado el porcentaje del tejido tumoral en el ganglio. BRAF^{WT}=tejido no portadores de la mutación en BRAF.

El estado mutacional de BRAF fue concordante entre el tumor primario y las metástasis en 63 de los 70 casos (90% de concordancia). Analizando por separado se objetivó una concordancia de: 88.2% (45/51) en metástasis ganglionares, del 93.3% (14/15) en metástasis en partes blandas y del 100% (4/4) en metástasis hematógenas.

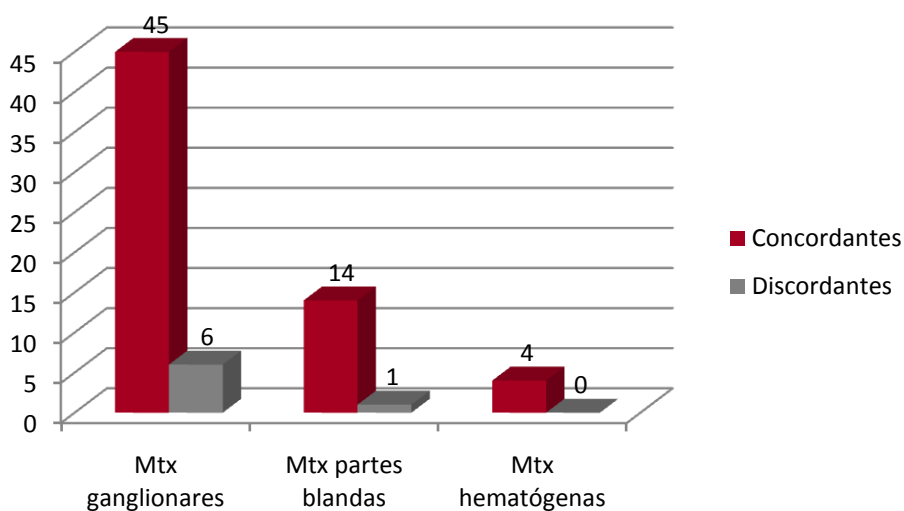


Fig.33.- Concordancia entre tumor primario y las distintas metástasis. Se objetiva discordancia discreta en metástasis ganglionares y en partes blandas. Mtx= metástasis.

Los tumores no portadores de la mutación mostraron una concordancia del 100% con las metástasis ganglionares, cutáneas y hematógenas. Los tumores portadores de la mutación (BRAF^{V600E}) mostraron una concordancia global del 85%, en metástasis ganglionares del 88%, en partes blandas del 93% y en hematógenas del 100% (tabla 9).

ID	BRAFprim	BRAFgg	BRAFpb	BRAFhem	ID	BRAFprim	BRAFgg	BRAFpb	BRAFhem
6	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	5	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
33	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	17	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
43	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	24	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
47	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	29	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
52	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	36	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
60	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	37	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
62	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	46	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
72	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	53	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
73	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	55	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
75	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	99	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
77	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	104	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
86	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	112	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
89	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	136	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
108	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	144	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
111	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	152	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	SL
121	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	149	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL	BRAF ^{WT}
124	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	115	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL
129	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	64	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	SL
134	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	91	BRAF ^{WT}	SL	BRAF ^{WT}	SL
137	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	119	BRAF ^{WT}	SL	BRAF ^{WT}	SL
143	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	SL	140	BRAF ^{WT}	SL	SL	BRAF ^{WT}
10	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL					
31	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL					
76	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL					
123	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL					
151	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL					
101	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}	SL	BRAF ^{V600E}					
120	BRAF ^{V600E}	SL	SL	BRAF ^{V600E}					
13	BRAF ^{V600E}	SL	BRAF ^{V600E}	SL					
50	BRAF ^{V600E}	SL	BRAF ^{V600E}	SL					
58	BRAF ^{V600E}	SL	BRAF ^{V600E}	SL					
15	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	SL					
97	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	SL					
23	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	SL	SL					
102	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	SL	SL					
109	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	SL	SL					
45	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{WT}	SL	SL					
114	BRAF ^{V600E}	SL	BRAF ^{WT}	SL					

Tablas 9.- Tumores primarios portadores (BRAF^{V600E}) y no portadores de la mutación (BRAF^{WT}). Concordancia con sus metástasis.
 BRAFprim = estado de BRAF en tumor primario;
 BRAFgg = estado de BRAF en metástasis ganglionar; BRAFpb = estado de BRAF en metástasis en partes blandas; BRAFhem = estado de BRAF en metástasis hematógenas; SL= sin lesión.

Uno de los casos mostró resultados muy llamativos. Se trataba de un paciente diagnosticado de dos melanomas primarios simultáneamente: un melanoma de extensión superficial de 1'55 mm de índice de Breslow no ulcerado localizado en la espalda en la región escapular derecha; y un melanoma nodular ulcerado de 7'1mm de índice de Breslow localizado en la espalda en zona lumbar derecha. Tras cuatro meses del diagnóstico el paciente desarrolló metástasis axilares derechas macroscópicas por lo que fue realizada una linfadenectomía terapéutica. Se consideró al paciente un estadio IIIA (atribuyéndose la metástasis al MES escapular derecho por su mayor proximidad) y se pautó adyuvancia con IFN, no incluyéndolo como candidato a otros tratamientos. Posteriormente desarrolló numerosas metástasis cutáneas y subcutáneas en cara lateral del tórax y pectoral derechos (Fig.35), por lo que inició tratamiento con DTIC y más tarde ipilimumab, en ambos casos con progresión a metástasis hematógenas pulmonares y óseas. Se realizó entonces el estudio mutacional mostrando que el MES escapular era BRAF^{WT} y el MN era BRAF^{V600E}, las metástasis axilares y en partes blandas en cambio eran BRAF^{V600E}. Tras iniciar Vemurafenib presentó una mejoría significativa de todas las lesiones pero precisó reducción de dosis por toxicidad cutánea. Tras 7 meses de tratamiento presentó progresión cutánea y cerebral, falleciendo el paciente a los pocos meses.

El estudio mutacional en este caso nos permitió ver que las metástasis ganglionares y cutáneas inicialmente atribuidas al melanoma escapular y clasificadas en un estadio III, se trataban en realidad de metástasis a distancia del melanoma lumbar, y por tanto era un paciente en estadio IV ya entonces candidato a BRAFi que se hubiese beneficiado de una mayor precocidad de dicho tratamiento. Se puso así en evidencia la importancia de la realización del estudio mutacional en la metástasis cuando esta está disponible.

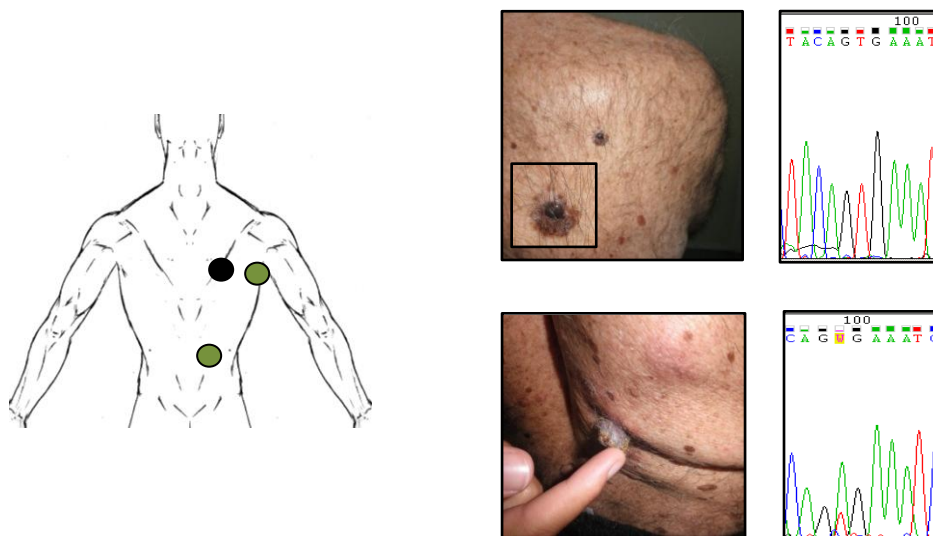


Fig.34.- Paciente con dos melanomas primarios. Melanoma de extensión superficial en escapular derecho BRAF^{WT}, melanoma nodular lumbar derecho BRAF^{V600E} y metástasis ganglionares axilares BRAF^{V600E}.

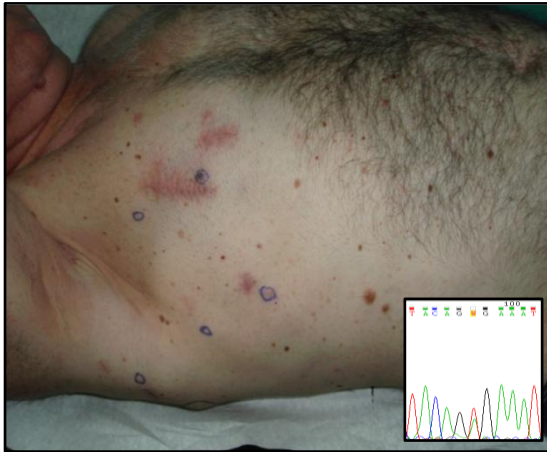


Fig.35.- Metástasis cutáneas, subcutáneas y cicatriz de linfadenectomía axilar derecha en el mismo paciente. El estudio de la mutación evidenció que eran lesiones BRAF^{V600E}.

2.3. Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con variables clínicas

2.3.1. Tumor primario y variables clínicas

Se realizaron análisis que permitiesen correlacionar la mutación en el tumor primario con las distintas variables clínicas. La media de edad de los pacientes portadores de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario fue de 57 años. La edad no mostró asociación significativa con la mutación, tampoco cuando se realizaron análisis por subgrupos:

- Menor de 40, 40-60 y mayor de 60 años (p=0.377)
- Menor o igual a 60 y mayor de 60 años (p=0.189)
- Menor de 50 y mayor o igual a 50 años (p=0.233)

La localización no mostró asociación significativa con la mutación aunque destacaba una clara predominancia de lesiones mutadas en tronco (60%) y extremidades (58.2%). Llamaba la atención la presencia de 6 melanomas en sacro, todos ellos mutados (Fig.36).

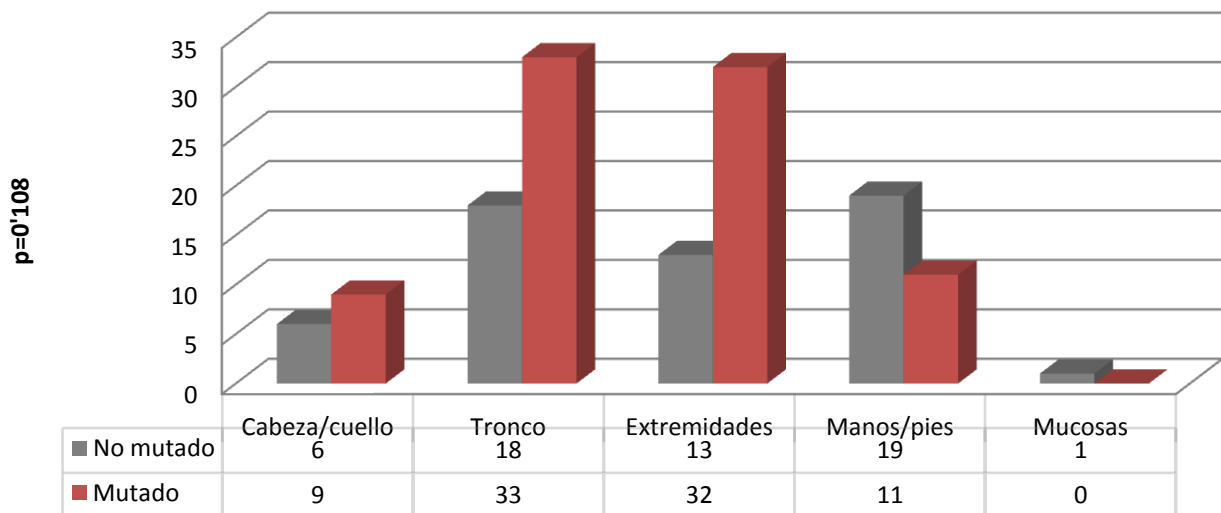


Fig.36.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con la localización del tumor primario.

El patrón de exposición solar intermitente se asoció ($p=0.003$) con la presencia de la mutación, presentándola hasta un 66.7% de estos tumores. Los melanomas localizados en zonas acras y de exposición crónica presentaban una menor frecuencia de la mutación (34.5% y 40.7% respectivamente) (Fig.37).

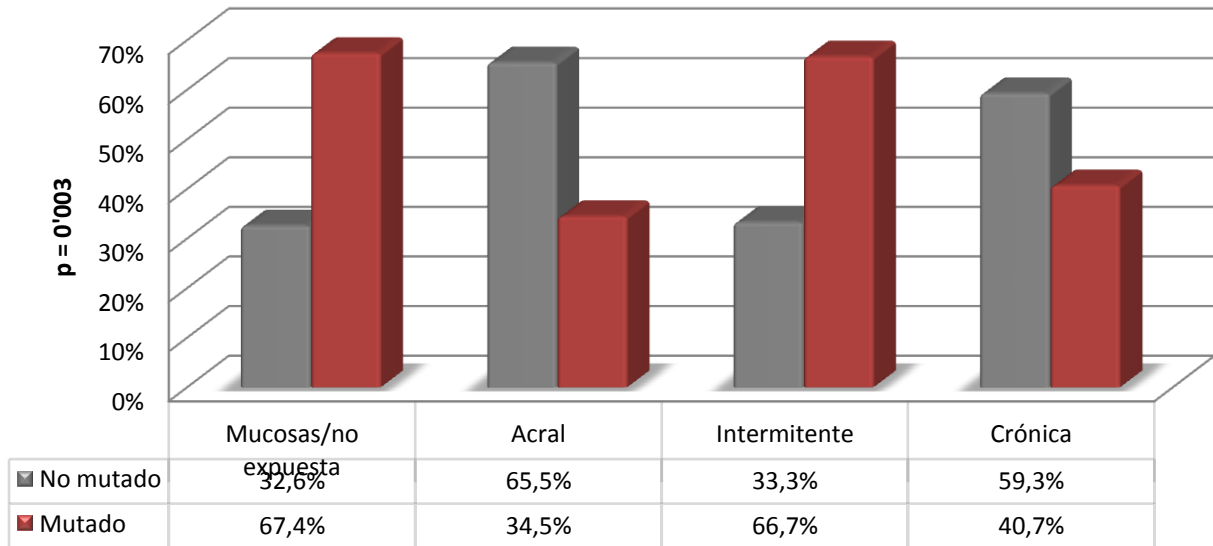
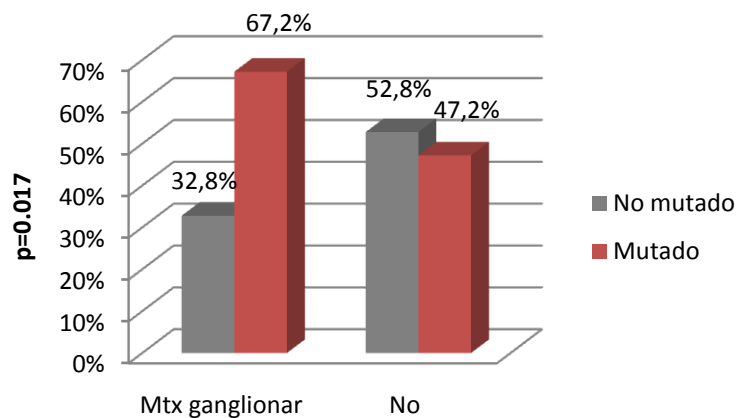


Fig.37.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con el patrón de exposición solar.

Las variables raza, exposición a cabina de rayos UVA, antecedentes de vitiligo e inmunodepresión presentaban un tamaño muestral muy bajo de pacientes por lo que se excluyeron del análisis. El sexo, el fototipo, la presencia de múltiples nevus, las quemaduras solares en la infancia, los antecedentes personales o familiares de melanoma y los antecedentes familiares de otra neoplasia no presentaron asociación significativa con la presencia de la mutación en el tumor primario (tabla 10).

La presencia de metástasis ganglionares sí mostró una asociación significativa con la mutación en el tumor primario ($p=0.017$) (Fig.38). El estadio tumoral AJCC en cambio no mostró asociación significativa ($p=0.086$).

Fig.38.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con metástasis ganglionares.



<i>Variables clínicas</i>	Pacientes primario BRAF^M/Total pacientes	p
Edad		
<50 años	25/39 (64.1%)	0.233
≥50 años	60/113 (53.1%)	
Sexo		
Hombre	37/68 (54.4%)	0.736
Mujer	48/84 (57.1%)	
Localización		
Tronco	33/51 (64.7%)	0.108
Extremidades	32/55 (58.2%)	
Manos y pies	11/30 (36.7%)	
Cabeza y cuello	9/15 (60%)	
Mucosa	0/1 (0%)	
Exposición solar		
Intermitente	62/92 (67.4%)	0.003
Crónica	11/27 (40.7%)	
Acral	10/29 (34.5%)	
Mucosa/no expuesta	2/3 (66.7%)	
Múltiples nevus (n>20)		
Sí	6/15 (40%)	0.208
No	68/119 (57.1%)	
Nevus displásicos		
Sí	6/12 (50%)	0.703
No	68/122 (55.7%)	
Fototipo		
II	28/50 (56%)	0.398
III	20/33 (60.6%)	
IV	1/4 (25%)	
Quemaduras solares infancia		
Sí	19/38 (50%)	0.999
No	4/8 (50%)	
Ant.personales melanoma		
Sí	4/8 (50%)	0.729
No	81/144 (56.2%)	
Ant. familiares melanoma		
Sí	5/8 (62.5%)	0.688
No	79/143 (62.5%)	
Ant.personales otra neoplasia		
Colon	1/3 (33.3%)	0.478
Mama	1/3 (33.3%)	
Hematológica	1/5 (20%)	
C.Basocelular	6/12 (50%)	
Otras	2/4 (50%)	
No	73/124 (58.9%)	
Ant. familiares otra neoplasia		
Colon	3/5 (60%)	0.936
Mama	5/8 (62.5%)	
Pulmón	3/5 (60%)	
Otras	6/12 (50%)	
No	31/63 (49.2%)	

Tabla 10.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario con variables clínicas.

La mortalidad por melanoma, así como la presencia de lesiones metastásicas de melanoma en general y más específicamente metástasis satélites, en tránsito, hematógenas, cutáneas y ganglionares a distancia, no se asoció significativamente con la mutación en el tumor primario (tabla 11).

<i>Variables clínicas</i>	Pacientes primario BRAF^M/Total pacientes	P
Fallecimiento por melanoma		
Sí	12/28 (42.9%)	0.132
No	64/109 (58.7%)	
Metástasis melanoma		
Sí	47/79 (59.5%)	0.412
No	37/34 (52.1%)	
Satelitosis		
Sí	15/24 (62.5%)	0.414
No	63/118 (53.4%)	
Metástasis ganglionares		
Sí	43/64 (67.2%)	0.017
No	42/87 (47.7%)	
Metástasis en tránsito		
Sí	10/15 (66.7%)	0.350
No	68/126 (54%)	
Metástasis cutáneas a distancia		
Sí	9/15 (60%)	0.676
No	69/127 (54.3%)	
Metástasis ganglionares a distancia		
Sí	6/15 (40%)	0.229
No	71/126 (56.3%)	
Metástasis hematógenas		
Sí	16/33 (48.5%)	0.352
No	64/111 (57.7%)	
Estadio AJCC		
I	20/30 (66.7%)	0.086
II	17/41 (41.5%)	
III	27/41 (65.9%)	
IV	21/39 (53.8%)	
Estadio AJCC agrupado		
I-II	37/71 (52.1%)	0.329
III-IV	48/80 (60%)	

Tabla 11.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario con presencia de metástasis y mortalidad por melanoma.

2.3.2. Metástasis y variables clínicas

Se realizó de forma complementaria un análisis para valorar la asociación de la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en las lesiones metastásicas con las variables clínicas. Los resultados no mostraron asociación con la edad, sexo, localización del tumor primario, patrón de exposición solar, presencia de múltiples nevus o nevus displásicos, antecedentes personales o familiares de melanoma, estadio AJCC, supervivencia libre de progresión o supervivencia global.

<i>Variables clínicas</i>	Pacientes metástasis BRAF^M/Total pacientes con metástasis	<i>P</i>
Edad		
<50 años	7/17 (41.2%)	0.255
≥50 años	23/39 (59%)	
Sexo		
Hombre	13/23 (56.5%)	0.789
Mujer	17/33 (51.5%)	
Localización		
Tronco	14/23 (60.9%)	0.228
Extremidades	10/17 (58.8%)	
Manos y pies	3/11 (27.3%)	
Cabeza y cuello	3/4 (75%)	
Mucosa anal	0/1 (0%)	
Exposición solar		
Intermitente	21/34 (61.8%)	0.238
Crónica	4/8 (50%)	
Acral	3/11 (27.3%)	
Mucosas	2/3 (66.7%)	
Múltiples nevus (n>20)		
Sí	2/4 (50%)	0.228
No	22/41 (53.7%)	
Nevus displásicos		
Sí	1/4 (25%)	0.326
No	23/41 (56.1%)	
Ant.personales melanoma		
Sí	4/8 (50%)	0.729
No	81/144 (56.2%)	
Ant. familiares melanoma		
Sí	2/2 (100%)	0.492
No	27/53 (50.9%)	
Estadio AJCC		
III	17/31 (54.8%)	0.976
IV	12/23 (52.2%)	

Tabla 12.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis con variables clínicas.

2.4. Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con variables anatomopatológicas

2.4.1. Tumor primario y variables anatomopatológicas

El estudio de la asociación de la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario con variables histopatológicas mostró una asociación significativa ($p < 0.001$) con el subtipo histológico, siendo hasta un 68.7% de los MES portadores de la mutación (Fig. 39).

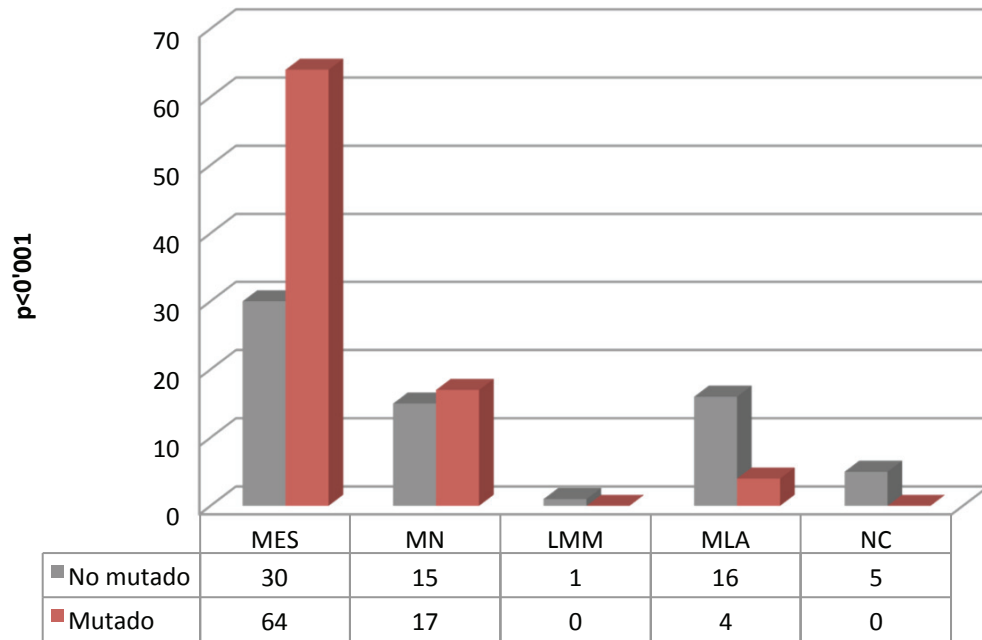


Fig.39.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con el subtipo histológico en el tumor primario.

La consumición epidérmica presentó asociación significativa con los tumores primarios portadores de BRAF^{V600E}, encontrándose en hasta un 65.5% de los tumores mutados ($p = 0.001$) (Fig.40). La invasión perivascular (65.6%) se asoció también de forma significativa ($p = 0.045$) (Fig.41), no así la invasión intravascular ni perineural.

Los factores considerados de mal pronóstico como la ulceración, el índice de Breslow, presencia de mitosis, el índice mitótico o el nivel de Clark no mostraron una asociación significativa con la presencia de la mutación (tabla 13). La agrupación del índice de Breslow en distintos rangos tampoco evidenció una asociación significativa:

- Agrupación $< 0.75\text{mm}$; $0.75\text{-}1\text{mm}$; $1.01\text{-}2\text{mm}$; $2.01\text{-}4\text{mm}$; $> 4\text{mm}$ ($p = 0.531$)
- Agrupación $\leq 1\text{mm}$; $1.01\text{-}3.99\text{mm}$; $\geq 4\text{mm}$ ($p = 0.805$)

Tanto el patrón pagetoide como polipoide no mostraron asociación significativa con la presencia de la mutación.

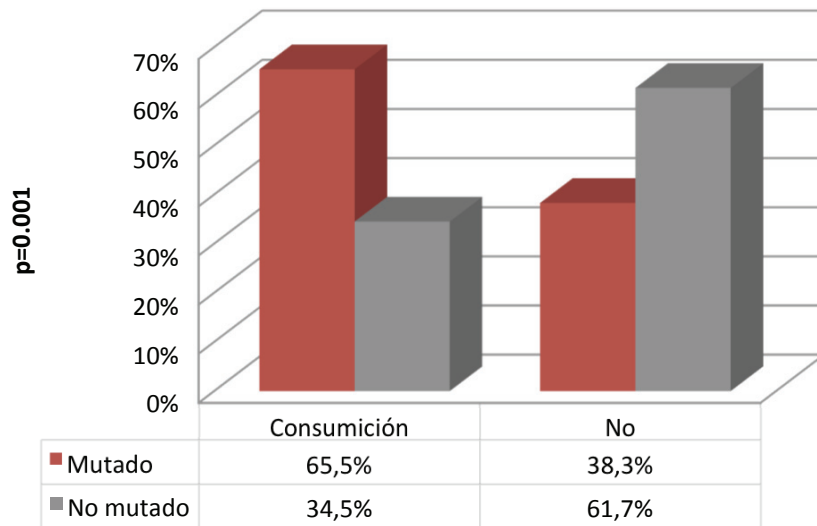


Fig.40.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con la consumo epidérmica en el tumor primario.

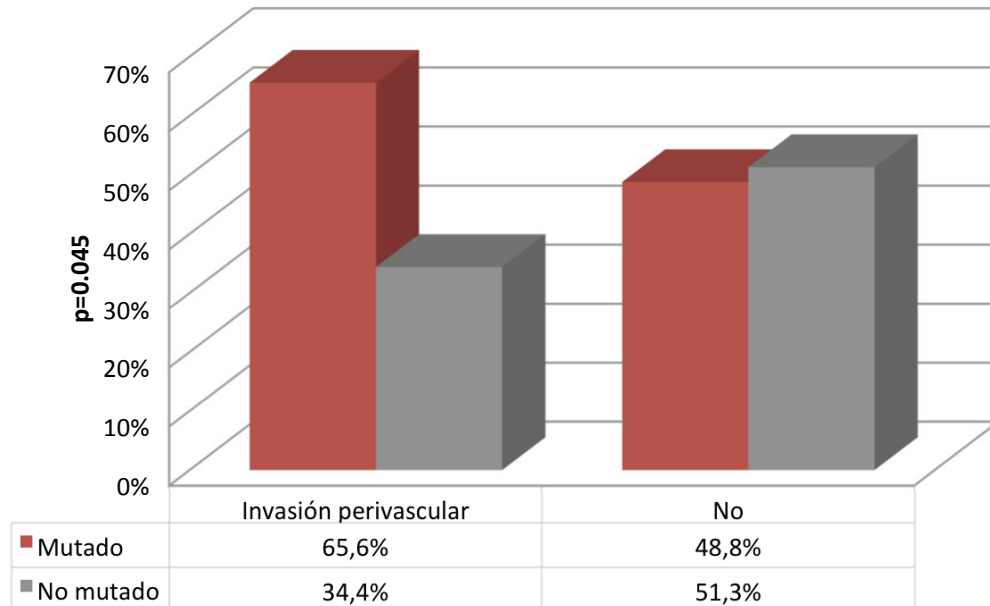


Fig.41.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} con la invasión perivascular en el tumor primario.

La regresión no mostró asociación significativa, tampoco el subtipo (temprana o tardía) ni la extensión de esta (focal o extensa). El infiltrado inflamatorio, tanto intratumoral como peritumoral, se mostró homogéneamente distribuido en los tumores primarios tanto en los mutados como en los no mutados. Tampoco la celularidad que lo constituía (linfocitaria o linfoplasmocitaria) mostró asociación (tabla 13). Otras características como la celularidad predominante, la presencia de atipia, elastosis, epidermotropismo, fase de crecimiento, necrosis, discohesión celular, micronódulos, satelitosis, discohesión celular, mitosis atípicas o nevus asociados, no mostraron asociación significativa. Los melanomas portadores de la mutación eran con más frecuencia lesiones epitelioides, con epidermotropismo, intensamente pigmentadas,

pagetoides, con micronódulos y escasas mitosis atípicas aproximándose a la significación estadística ($p < 0.1$) aunque sin alcanzarla.

<i>Variables histopatológicas</i>	Pacientes primario BRAF^M/Total pacientes	P
Subtipo		
MES	64/93(68.7%)	<0.001
MN	17/31 (54.8%)	
LMM	0/1 (0%)	
MLA	4/20(20%)	
NC	0/5 (0%)	
Ulceración		
Sí	38/77 (49.4%)	0.184
No	44/71 (62%)	
Clark		
I	1/1 (100%)	0.093
II	4/6 (66.7%)	
III	17/34 (50%)	
IV	55/87 (63.2%)	
V	8/22 (36.4%)	
Índice de Breslow		
<0.75 mm	1/5 (20%)	0.532
0.75-1 mm	6/9 (66.7%)	
1.01-2 mm	28/48 (58.3%)	
2.01-4 mm	28/50 (56%)	
>4 mm	21/38 (55.3%)	
Celularidad		
Epitelioide	38/58 (65.5%)	0.059
Fusocelular	9/28 (32.1%)	
Névíca	25/47 (53.2%)	
Spitzoide	9/14 (64.3%)	
Plasmocitoide	1/2 (50%)	
Elastosis		
Sí	16/35 (45.7%)	0.249
No	62/109 (56.9%)	
Epidermotropismo		
Sí	60/101 (59.4%)	0.094
No	21/47 (44.7%)	
Consumición epidérmica		
Sí	57/87 (65.5%)	0.002
No	23/60 (38.3%)	
Fase de crecimiento		
Radial	5/8 (62.5%)	0.700
Vertical	80/144 (55.6%)	
Pigmentación		
Sí	68/115 (59.1%)	0.064
No	14/34 (41.2%)	
Atipia citológica		
Sí	79/144 (54.9%)	0.835
No	2/4 (50%)	
Necrosis		
Sí	4/11 (36.4%)	0.340
No	76/134 (56.7%)	
<i>Variables histopatológicas</i>	Pacientes primario BRAF^M/Total pacientes	P
Satelitosis microscópicas		

Sí	4/7 (57.1%)	0.918
No	75/137 (54.7%)	
Micronódulos		
Sí	17/24 (70.8%)	0.078
No	63/123 (51.2%)	
Discohesión		
Sí	16/29 (55.2%)	0.964
No	64/118 (54.2%)	
Nevus asociado		
Sí	19/32 (59.4%)	0.679
No	63/114 (55.3%)	
Invasión linfovascular		
Sí	10/20 (50%)	0.570
No	81/145 (55.9%)	
Invasión perivascular		
Sí	42/64 (65.6%)	0.045
No	39/80 (65.6%)	
Invasión perineural		
Sí	2/3 (66.7%)	0.697
No	77/139 (55.4%)	
Infiltrado inflamatorio peritumoral		
Sí	59/107 (55.1%)	0.891
No	22/39 (56.4%)	
Infiltrado inflamatorio intratumoral		
Sí	21/36 (58.3%)	0.593
No	58/109 (53.2%)	
Celularidad inflamatoria		
Linfocitario	47/88 (53.4%)	0.593
Linfoplasmocitario	12/20 (60%)	
Regresión		
Sí	26/43 (60.5%)	0.434
No	55/103 (53.4%)	
Tipo de regresión		
Temprana	8/13 (61.5%)	0.999
Tardía	16/26 (61.5%)	
Extensión de regresión		
Focal	16/29 (55.2%)	0.164
Extensa	8/10 (80%)	
Mitosis		
Sí	65/119 (54.6%)	0.662
No	16/27 (59.3%)	
Mitosis atípicas		
Sí	11/27 (40.7%)	0.083
No	64/108 (59.3%)	
Pagetoide		
Sí	22/32 (68.8%)	0.078
No	60/117 (51.3%)	
Polipoide		
Sí	40/72 (55.6%)	0.747
No	37/70 (52.9%)	

Tabla 13.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario con variables anatomopatológicas.

2.4.2. Metástasis ganglionar y variables anatomopatológicas

Se estudiaron las características histopatológicas de las metástasis ganglionares y su asociación con la presencia de la mutación en la metástasis (tabla 14). Las metástasis portadoras de BRAF^{V600E} presentaban con mayor frecuencia afectación extracapsular (p=0.017) y necrosis (p=0.016) (Figs.42 y 43). El tipo de afectación (p=0.370) no evidenció asociación (tabla 14).

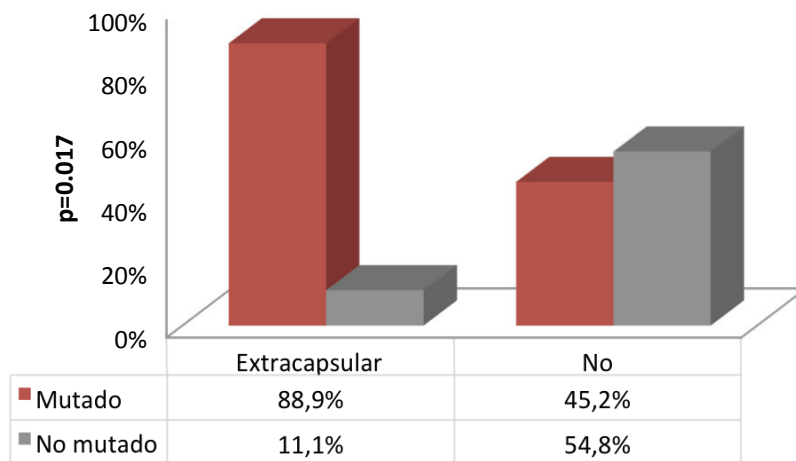


Fig.42.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar con la extensión extracapsular.

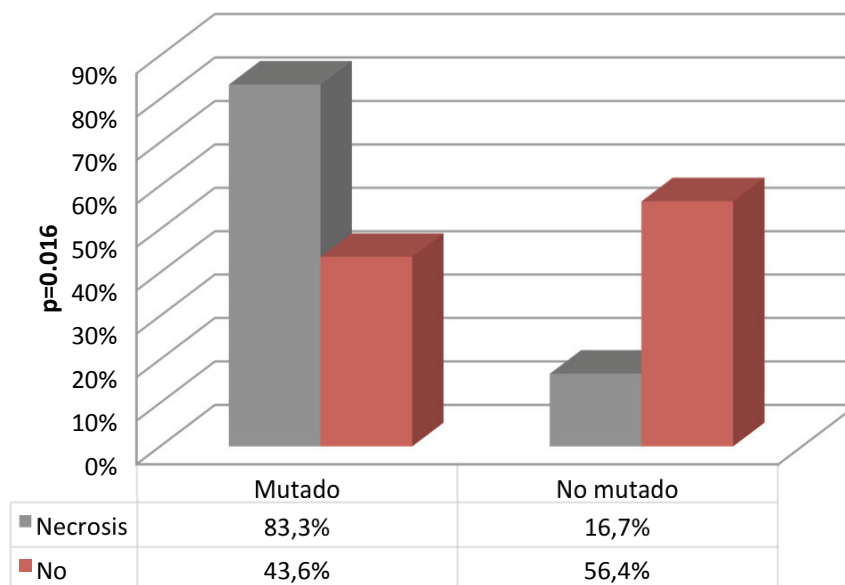


Fig.43.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar con la necrosis.

<i>Variables histológicas ganglio</i>	Pacientes metástasis ganglionar BRAF^M/Total pacientes	P
Metástasis extracapsular		
Sí	8/9 (88.9%)	0.017
No	19/42 (45.2%)	
Metástasis con necrosis		
Sí	10/12 (83.3%)	0.016
No	17/39 (43.6%)	
Afectación ganglionar		
Masiva (>90%)	8/11 (72.7%)	0.997
Intraparenquimatosa	3/8 (37.5%)	
Subcapsular	5/12 (41.7%)	
Subcapsular+intraparenquimatosa	11/20 (55%)	

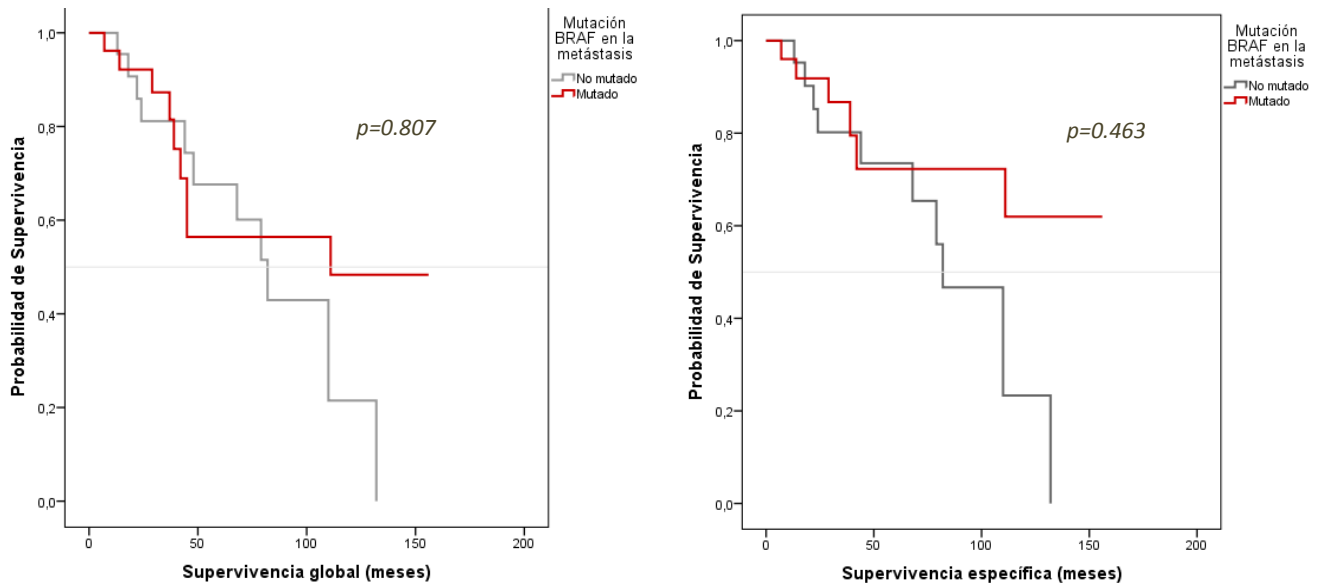
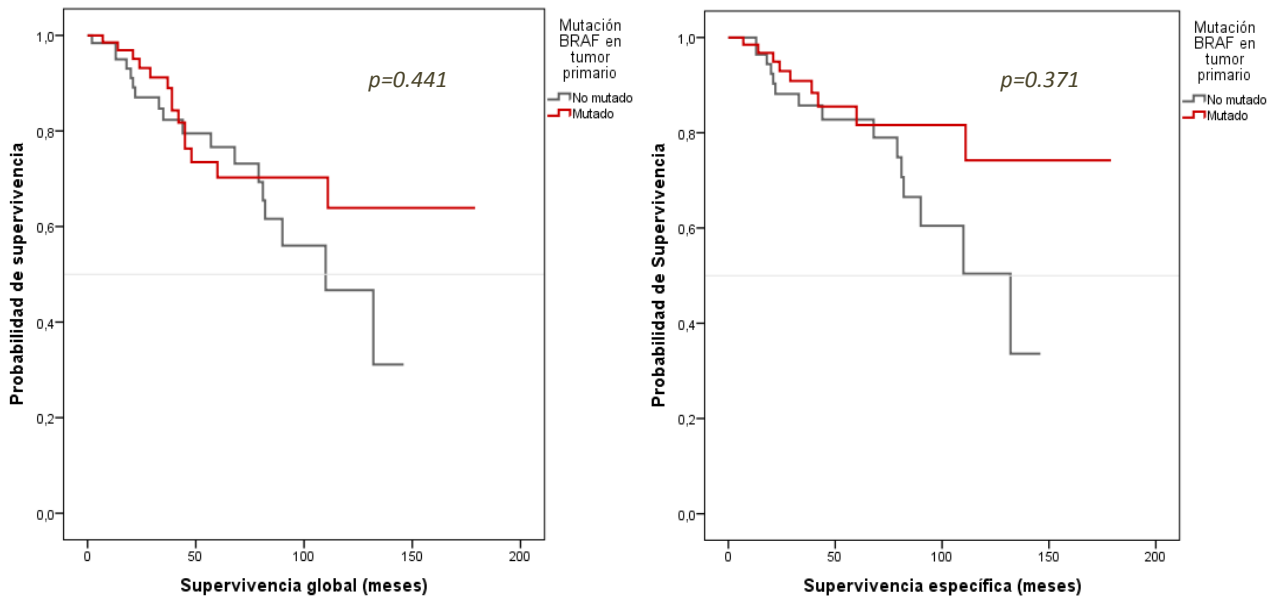
Tabla 14.- Asociación de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar con variables anatomopatológicas en el ganglio.

3. Valor de la mutación en el tumor primario y en la metástasis como factor pronóstico

Dado que cuatro pacientes iniciaron tratamiento con ipilimumab durante el estudio y este ha mostrado afectar a la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG), se decidió excluir a estos pacientes para el análisis pronóstico, uno de ellos además fue tratado con vemurafenib. Ninguno de los restantes pacientes había sido tratado con terapia dirigida ni anti-PD1. El seguimiento de dos pacientes superior a 20 años era muy prolongado en el tiempo (254 y 346 meses) por lo que también se omitió su análisis en los estudios de supervivencia.

La supervivencia media de los pacientes del estudio fue de 9.9 años (118.88 meses IC 95% 103.59-134.17), siendo la supervivencia a 5 años de un 69% y a los 10 años de un 69%. La supervivencia atribuible de forma específica a la enfermedad (muerte por melanoma) fue de un 78% y 60% a los 5 y 10 años respectivamente. Al valorar la presencia de la mutación BRAF^{V600E} como factor pronóstico se objetivó que los pacientes que la presentaban en el tumor primario tenían una supervivencia media de 10.5 años (126.87 meses IC95% 101.45-147.30) frente a 8.1 años en aquellos que no la presentaban (98.23 IC95% 82.77-113.70). La supervivencia específica de la enfermedad mostraba valores incluso superiores con una media de 11.9 años (143.07 meses IC95% 123.83-162.32) frente a 8.5 años (103.10 meses IC95% 87.57-118.64) en aquellos no portadores de la mutación. En el caso de la presencia de la mutación en la metástasis (y también específicamente en las metástasis ganglionares) se objetivaba también una mayor supervivencia

tanto global como específica en los pacientes con metástasis portadoras de la mutación. Ninguno de estos valores presentó una asociación estadísticamente significativa (tabla 15).



		Media		I.C. 95%		p valor	Supervivencia	
		Estimación	Error típico	Inferior	Superior		5 años	10 años
SUPERVIVENCIA GLOBAL								
General		122.694	7.895	107.220	138.169		72%	56%
BRAF tumor primario	<i>No mutado</i>	99.516	7.993	83.849	115.182	0.441	74%	32%
	<i>Mutado</i>	132.639	10.442	112.172	153.105		70%	63%
BRAF MTX	<i>No mutado</i>	80.742	10.746	59.679	101.805	0.807	61%	0%
	<i>Mutado</i>	99.477	14.042	71.955	127.000		57%	47%
BRAF MTX ganglionar	<i>No mutado</i>	79.873	10.846	58.615	101.131	0.868	53%	0%
	<i>Mutado</i>	105.029	16.404	72.876	137.181		59%	59%
SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA								
General		132.563	7.957	116.968	148.158		80%	63%
BRAF tumor primario	<i>No mutado</i>	104.627	8.001	88.945	120.310	0.371	80%	35%
	<i>Mutado</i>	147.378	9.673	128.420	166.336		81%	73%
BRAF MTX	<i>No mutado</i>	83.832	11.056	62.164	105.501	0.463	66%	0%
	<i>Mutado</i>	116.294	13.732	89.380	143.208		72%	60%
BRAF MTX ganglionar	<i>No mutado</i>	86.659	11.380	64.353	108.964	0.704	62%	0%
	<i>Mutado</i>	118.629	16.446	86.394	150.864		72%	72%
SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN								
General		117.721	8.298	101.457	133.984		67%	54%
BRAF tumor primario	<i>No mutado</i>	94.135	9.274	75.958	112.313	0.655	62%	51%
	<i>Mutado</i>	125.393	10.719	104.384	146.403		71%	58%
BRAF MTX	<i>No mutado</i>	60.723	10.007	41.110	80.336	0.603	47%	0%
	<i>Mutado</i>	80.894	14.217	53.030	108.759		54%	34%
BRAF MTX ganglionar	<i>No mutado</i>	62.441	10.077	42.690	82.193	0.536	46%	33%
	<i>Mutado</i>	84.769	16.019	53.372	116.165		55%	39%

Tabla 15.- Análisis de supervivencia. Estudio de la supervivencia global, específica y libre de progresión y su relación con la presencia de la mutación en el tumor primario, en las metástasis y, más específicamente, en la metástasis ganglionar. MTX=metástasis.

La media de supervivencia libre de progresión fue de 9.5 años (114.92 meses IC95% 98.791-131.064), con una SLP a los 5 años del 65% y a los 10 años del 53%. La SLP mostró ser mayor en aquellos pacientes portadores de la mutación BRAF^{V600E} tanto en el tumor primario, como en la metástasis y, más específicamente, en la metástasis ganglionar. En ningún caso alcanzó significación estadística (tabla 15).

Tanto la SG como la SE y la SLP mostraron, por tanto, ser mayores en aquellos pacientes portadores de la mutación, aunque en ningún caso dicha asociación fue estadísticamente significativa.

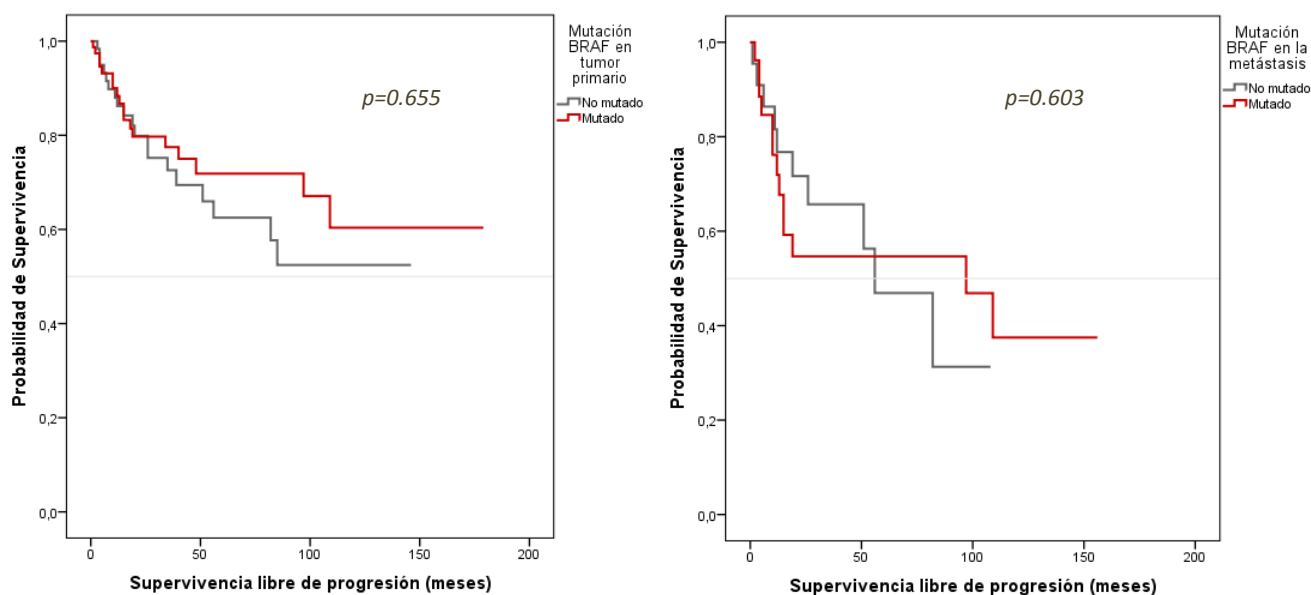


Fig.46.- Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión en pacientes portadores de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario y en la metástasis. Comparativa de pacientes portadores de la mutación versus no mutados.

4. Regresión logística

4.1. Mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario

Con el objeto de cuantificar la asociación entre las variables estadísticamente significativas o con p valor <0.1 se realizó un análisis de regresión logística univariante. Dado el bajo tamaño muestral en las categorías de algunas variables se realizaron agrupaciones. Los resultados se muestran en la tabla 15 donde podemos observar como la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario se asocia con:

- El patrón de exposición solar intermitente (OR 3.01 IC 95% 1.24-7.27 $p=0.015$) y la presencia de metástasis ganglionares (OR 2.24 IC 95% 1.15-4.38 $p=0.018$) se asocian a la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario.
- El estadio II de la AJCC (OR 0.35 IC 95% 0.13-0.94 $p=0.038$) se asocia con la ausencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario.
- El subtipo histológico MES (OR 11.73 IC 95% 3.71-37.06 $p<0.001$) y MN (OR 6.23 IC 95% 1.75-22.23 $p=0.005$), la consumición epidérmica (OR 3.6 IC 95% 1.54-6.05, $p=0.001$), la invasión perivascular (OR 2.01 IC 95% 1.02-3.95, $p=0.044$) y la celularidad epitelioides (OR

4.01 IC 95% 1.54-10.48 p=0.005) son factores histológicos que se asocian con la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario.

		B	p-valor	OR	I.C. 95% para OR	
					Inferior	Superior
Patrón exposición solar	Crónica		0,002			
	Acral + Mucosas	-0,18	0,729	0,83	0,29	2,36
	Intermitente	1,10	0,015	3,01	1,24	7,27
Metástasis ganglionar	Sí vs no	0,81	0,018	2,24	1,15	4,38
Estadio AJCC	I		0,092			
	II	-1,04	0,038	0,35	0,13	0,94
	III	-0,04	0,943	0,96	0,36	2,61
	IV	-0,54	0,284	0,58	0,22	1,56
Subtipo histológico	MLA + LMM + Otros		<0,001			
	MES	2,46	<0,001	11,73	3,71	37,06
	MN	1,83	0,005	6,23	1,75	22,23
	Consumición epidérmica	Sí vs no	1,12	0,001	3,06	1,54
Invasión perivascular	Sí vs no	0,70	0,044	2,01	1,02	3,95
Celularidad predominante	Fusocelular		0,037			
	Epitelioide	1,39	0,005	4,01	1,54	10,48
	Néfica	0,88	0,080	2,40	0,90	6,38
	Otras	1,26	0,055	3,52	0,97	12,73
Micronódulos	Sí vs no	0,84	0,083	2,31	0,90	5,97
Epidermotropismo	Sí vs no	0,59	0,096	1,81	0,90	3,64
Nivel de Clark	I - II		0,102			
	III	-0,92	0,311	0,40	0,07	2,35
	IV	-0,37	0,665	0,69	0,13	3,75
	V	-1,48	0,119	0,23	0,04	1,46
Pigmentación	Sí vs no	0,73	0,067	2,07	0,95	4,50
Mitosis atípicas	Sí vs no	-0,75	0,087	0,47	0,20	1,12
Patrón pagetoide	Sí vs no	-0,73	0,082	2,09	0,91	4,79

Tabla 16.- Análisis de regresión logística univariante de las variables que mostraron asociación con valores de p<0.1 en el tumor primario.

Posteriormente se realizó un análisis multivariante con el objetivo de ajustar las variables que fueron estadísticamente significativas tanto clínica como histológicamente en el tumor primario (tablas 16 y 17). Se objetivó que la asociación se mantenía significativa en el patrón de exposición solar intermitente y la presencia de metástasis ganglionares. En el caso de las variables histopatológicas tanto el subtipo MES como MN mantenían la significación, no así la consumición epidérmica ni la celularidad epitelioide. La presencia de invasión perivascular se mantenía próxima a la significación estadística aunque sin alcanzarla.

		B	p-valor	OR	I.C. 95% para OR	
					Inferior	Superior
Patrón exposición solar	Crónica		0,004			
	Acral + Mucosas	-0,240	0,659	0,787	0,271	2,280
	Intermitente	1,042	0,023	2,834	1,155	6,953
Metástasis ganglionar	Sí vs No	0,772	0,030	2,163	1,078	4,342
	Constante	-0,642	0,125	0,526		

Tabla 17.- Análisis de regresión logística multivariante de las variables clínicas que mostraron asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

		B	p-valor	OR	I.C. 95% para OR	
					Inferior	Superior
Subtipo histológico	MLA + LMM + Otros		0,003			
	MES	2,172	0,001	8,775	2,501	30,786
	MN	1,720	0,015	5,585	1,404	22,209
Consumición epidérmica	Sí vs No	0,635	0,116	1,887	0,855	4,164
Invasión perivascular	Sí vs No	0,736	0,069	2,087	0,944	4,617
Celularidad predominante	fusocelular		0,463			
	epitelioide	0,877	0,113	2,404	0,812	7,118
	néfica	0,532	0,355	1,702	0,552	5,253
	otras	0,485	0,513	1,625	0,379	6,967
	Constante	-2,766	0,000	0,063		

Tabla 18.- Análisis de regresión logística multivariante de las variables histopatológicas que mostraron asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

4.2. Mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar

En el análisis de regresión logística univariante, tanto la presencia de necrosis (OR 6.47 IC 95% 1.25-33.52 $p=0.026$) como de extensión extracapsular (OR 9.68 IC 95% 1.11-84.46 $p= 0.040$) en la metástasis ganglionar mostraron estar asociados significativamente con la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar (tabla 18).

		B	p-valor	OR	I.C. 95% para OR	
					Inferior	Superior
Afectación extracapsular ganglio	Sí vs no	2,27	0,040	9,68	1,11	84,46
Necrosis en el ganglio	Sí vs no	1,87	0,026	6,47	1,25	33,52

Tabla 19.- Análisis de regresión logística univariante de las variables que mostraron asociación con valores de $p < 0.1$ en la metástasis ganglionar.

Esta significación se perdía en el análisis multivariante debido a que ambas variables están asociadas entre sí ($p=0.027$). Se decidió crear una nueva variable definida por la presencia o ausencia de afectación extracapsular y/o necrosis en el ganglio. Se analizó la asociación de dicha variable con la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar encontrando una asociación significativa (tabla 19)

		B	p-valor	OR	I.C. 95% para OR	
					Inferior	Superior
Afectación extracapsular y/o necrosis	Sí vs no	1,87	0,010	6,50	1,56	27,05
	Constante	-0,41	0,240	0,67		

Tabla 20.- Asociación de la afectación extracapsular y/o necrosis con la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar.

V. DISCVSIÓN

1. LA MUTACIÓN BRAF

El melanoma cutáneo es una enfermedad influenciada por diversas alteraciones genéticas. En los últimos años, las alteraciones en la vía de la MAPK se han mostrado de gran relevancia en esta patología habiéndose planteado que sus mutaciones podrían no sólo influir en el desarrollo de la enfermedad²⁶⁷, sino también en su posterior progresión². De entre las posibles alteraciones en esta vía, la mutación en BRAF se ha evidenciado como una de las más frecuentes en el melanoma cutáneo.

Nuestro estudio analiza la presencia de la mutación BRAF^{V600E} tanto en los tumores primarios como sus metástasis correspondientes, recogiendo una amplia información sobre variables clínicas e histopatológicas. El tamaño muestral es uno de los más amplios analizados hasta ahora con 152 tumores primarios y 70 metástasis de melanoma. Se trata además de un estudio multicéntrico que permite obtener una muestra representativa de la población de Castilla y León. El análisis de la muestra refleja una distribución homogénea por sexos con una frecuencia discretamente superior de mujeres, una edad media alta de 58.7 años, un claro predominio de la raza caucásica con fototipos II-III y una frecuencia superior de tumores en extremidades probablemente condicionada por la predominancia del sexo femenino, todo ello correspondiente a la población esperada en nuestro medio. Llama la atención la baja frecuencia de antecedentes familiares y personales de melanoma (5%) así como otras neoplasias como el cáncer de páncreas, reflejando una baja frecuencia de melanoma familiar en esta población. Del mismo modo, a pesar de una mediana de edad avanzada en la muestra, destaca la baja frecuencia de lesiones con patrón de LMM, habiendo un claro predominio de MES en nuestros pacientes. Dado que el criterio de selección de la muestra era que se tratase de pacientes que hubiesen sido sometidos a estudio ganglionar (BSGC o linfadenectomía), cabe esperar una baja frecuencia de melanomas poco invasivos y por tanto una elevada representación de alto índice de Breslow, nivel de Clark y estadio AJCC. A pesar de ello la ulceración histológica se distribuía de forma homogénea en el estudio.

La mutación en el oncogen BRAF es una de las alteraciones moleculares más habituales en el melanoma cutáneo^{55, 56}, siendo BRAF^{V600E} la más frecuente. Aunque inicialmente la presencia de la mutación BRAF^{V600E} se describió con una frecuencia de hasta un 66%² en los melanomas, estudios posteriores agrupando distintas mutaciones en BRAF (BRAF^{V600E}, BRAF^{V600K}, BRAF^{V600G}, BRAF^{V600R}) han establecido dicha frecuencia entre un 41-48%^{30, 58, 250, 251, 268}. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran una frecuencia discretamente superior (55.9%) que podría deberse a

una mayor presencia del subtipo de extensión superficial y a un predominio en el patrón exposición solar intermitente, ambas características descritas en asociación con la presencia de la mutación.

	PRIMARIO	MTX	MTX GG	MTX HEM	MTX PB	MÉTODO	MUTACIÓN
Godoy y cols	55.9% (n=152)	55.7%(n=70)	52.9% (n=51)	50% (n=4)	66.7% (n=15)	PCR	BRAF ^{V600E}
Colombino y cols ²⁵⁰	43% (n=132)	48% (n=189)	43% (n=84)	40% (n=25)	53% (n=36)	S	BRAF ^{V600E+K}
Shinozaki y cols ²⁵¹	31% (n=58)	57% (n=68)				S	BRAF ^{V600E+G}
Chang y cols ²⁶⁸	44% (n=68)					S	BRAF ^{V600}
Kirschner y cols ⁵⁹			44% (n=54)			S	BRAF ^{V600}
Gorden y cols ²⁶⁹			50% (n=28)	44% (n=27)	32% (n=22)	S	BRAF ^{V600E+R+K}
Pollock y cols ⁴¹			83% (n=12)	64% (n=14)	63% (n=29)	S, PCR	BRAF ^{V600E}
Moreau y cols ²⁷⁰			40% (n=105)			S, PS	BRAF ^{V600E+K}

Tabla 21.- Frecuencia de la mutación BRAFV600 en tumor primario y metástasis. Estudios previos. MTX=metástasis, GG=ganglionar, HEM=hematógena, PB=partes blandas, S=secuenciación, PS=pirosecuenciación.

En lo que respecta a la frecuencia de la mutación en las metástasis, los resultados publicados hasta ahora son muy variables. En las metástasis ganglionares hemos objetivado una frecuencia del 52.9%, habiéndose descrito valores de entre el 40-83%^{41, 59, 254, 269, 271}. Las investigaciones que analizan la frecuencia en otras metástasis son escasas y con bajo tamaño muestral, tal y como se muestra en la tabla 20. En nuestro estudio el hallazgo de la mutación en un 66.7% de metástasis en partes blandas y un 50% de metástasis hematógenas, se muestra en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores mientras que la frecuencia en metástasis ganglionares es discretamente superior (52.9%). Dado que la presencia de metástasis ganglionares se ha asociado significativamente con la mutación y que nuestra muestra presenta una frecuencia elevada de tumores primarios BRAF^M, no sorprende encontrar una frecuencia superior de metástasis ganglionares mutadas. En cualquier caso parece probable que el predominio de tumores primarios BRAF^M en la muestra podría condicionar una mayor frecuencia de metástasis hematógenas, ganglionares y en partes blandas portadoras de la mutación.

2. ASOCIACIÓN CON VARIABLES CLÍNICAS

Las variables clínicas que se asocian de forma significativa con la presencia de mutación BRAF^{V600E} en nuestro estudio son el patrón de exposición solar y la presencia de metástasis ganglionares. No hemos encontrado asociación significativa, aunque sí muestra una mayor frecuencia, la localización de la lesión primaria en el tronco y extremidades. La edad, el sexo, el fototipo, la presencia de múltiples nevus y nevus displásicos, las quemaduras solares en la infancia, los antecedentes personales o familiares de melanoma, los antecedentes familiares de otra neoplasia, la presencia de metástasis hematógenas, en tránsito, satelitosis, cutáneas o ganglionares a distancia, el estadio AJCC, la mortalidad por melanoma, la SLP y la SG no presentan asociación con la presencia de la mutación en el tumor primario. El estudio de la mutación en la metástasis tampoco reveló asociación significativa con ninguna de las variables clínicas.

Patrón de exposición solar

El papel que desempeña la exposición solar en el desarrollo del melanoma cutáneo ha sido puesto en evidencia por numerosos estudios epidemiológicos²⁷²⁻²⁷⁷. A diferencia de lo que sucede con NRAS, donde las mutaciones en el codón 61 se asocian a alteraciones derivadas de la formación de dímeros de pirimidina (CC→TT o C→T) en relación a la exposición UV^{278, 279}, la sustitución de valina por lisina (GTG→GAG) en el nucleótido 1799 causante de la mutación más frecuente en BRAF no se ha podido asociar con la radiación UV. Tampoco se han evidenciado en los melanomas mutados ninguna de las alteraciones frecuentes en los tumores inducidos por la radiación UV².

La existencia de una baja frecuencia de la mutación en melanomas mucosos (o con nula exposición)^{70, 280} y acrales hizo pensar en la asociación de esta mutación con el daño solar. Es más, en un estudio se encontró una asociación significativa entre la presencia de la mutación en melanomas primarios con una mayor y más precoz exposición a la radiación UV a lo largo de la vida del paciente⁶⁰, aunque la información clínica se basaba en un cuestionario autoadministrado y una entrevista telefónica. Nuestro estudio no ha mostrado asociación significativa de la mutación con la presencia de quemaduras solares en la infancia o la exposición a cabinas de rayos UVA, aunque la disponibilidad de esta información en la historia clínica del paciente era baja.

Por otro lado, los pacientes portadores de mutaciones germinales en MC1R se caracterizan por una mayor producción de feomelanina que condiciona una capacidad disminuida de bronceado con un mayor número de quemaduras solares. Todo ello hace que con frecuencia presenten también daño crónico solar, acarreando un mayor riesgo de melanoma y cáncer de piel.

Recientemente se ha publicado que dichos pacientes, que también presentan con frecuencia un mayor grado de elastosis y daño actínico crónico, tendrían un menor riesgo de desarrollar tumores con mutaciones somáticas en BRAF²⁸¹. Este riesgo sería además especialmente bajo en los tumores localizados en zonas más expuestas como cabeza y cuello²⁸². En nuestro estudio la mutación no se ha asociado de forma significativa con el fototipo ni con la elastosis, por tanto no se puede establecer que estos pacientes tengan un menor riesgo de desarrollar tumores BRAF^M.

Utilizando la elastosis como marcador indirecto de daño por exposición solar crónica, algunos autores^{100, 101, 283} encuentran una menor prevalencia de daño actínico crónico en los tumores BRAF^M frente a los BRAF^{WT}. La mayor parte de las investigaciones coinciden en una asociación significativa de la presencia de la mutación en BRAF con el patrón de exposición solar intermitente y no con el patrón crónico^{30, 38, 45, 60, 83, 99, 284-287}. Podría pensarse que la asociación de melanomas BRAF^M con el patrón de exposición solar intermitente se debe a que éstos son más frecuentes en localizaciones poco expuestas como el tronco, cuya relación con la mutación ha sido apuntada en algunos estudios. Pero en un reciente estudio, Bauer y cols²⁸³ identifican en un análisis multivariante de pacientes procedentes de Europa, USA y Australia que el patrón de exposición solar es una variable significativamente asociada a la presencia de la mutación BRAF, sin influencia de la edad o de la localización anatómica de la lesión. En nuestro estudio la localización anatómica en cambio no se asoció significativamente con la mutación y sí lo hizo de forma robusta el patrón de exposición solar, apoyando la teoría de que el factor que significativamente influye en la presencia de la mutación no es tanto la localización anatómica como el patrón de exposición solar. La explicación a este fenómeno podría deberse a que, tal y como apuntan Curtin y cols⁴⁵, la exposición intermitente a la radiación solar podría hacer más susceptible a la piel a la radiación UV, dando lugar a una mayor probabilidad de adquirir la mutación BRAF.

Sexo y edad

Existen diversas publicaciones que analizan la asociación con variables clínicas, siendo de especial relevancia dos recientes meta-análisis^{30, 284} que incluyen a 2521 y 5744 pacientes. En la mayor parte de los estudios, la mutación no parece presentar una asociación significativa con el sexo^{30, 30, 38, 58, 100, 284, 288-290}, aunque sí se ha evidenciado de forma no significativa una mayor frecuencia en mujeres (45-46% ♀ y 23-40% ♂)^{30, 38, 251}. Esta mayor frecuencia es poco evidente en nuestro estudio (57.1% ♀ frente a 54.4% ♂). Respecto a la edad, numerosos análisis incluyendo un reciente meta-análisis³⁰, no han encontrado asociación significativa^{30, 38, 101, 268, 288}. Algunos

estudios sí indican asociación de la mutación con la aparición de melanoma cutáneo en pacientes jóvenes^{99-101, 271, 290, 291}, especialmente en menores de 50-60 años^{58, 251, 283-285, 289}. Nuestro estudio no muestra una asociación significativa con la edad, aunque la frecuencia de pacientes menores de 50 años es baja en la muestra (25.7%). Dicha predilección por pacientes de menor edad puede deberse al hecho de que los melanomas en pacientes jóvenes y de mediana edad son fundamentalmente MES y ocurren en áreas de exposición solar intermitente, mientras que en pacientes con edad superior a los 60-65 años los melanomas ocurren más en áreas de exposición solar crónica^{292, 293}. Esto podría condicionar una mayor frecuencia de la mutación en este rango de edad. Dado que la mayor parte de los estudios que obtienen una asociación significativa con la edad no realizan un ajuste mediante análisis multivariante con el subtipo histológico o el patrón de exposición solar cuando este es significativo, muchos de los resultados publicados hasta ahora deben valorarse con cautela.

Localización anatómica

El patrón de distribución anatómica del melanoma cutáneo ha sido ampliamente estudiado. Diversos estudios han establecido que la localización más frecuente de aparición del melanoma es la cara posterior tronco^{292, 294-296}. El orden descrito por frecuencia de aparición sería: tronco (46-57%), extremidades (37-46%) y cabeza y cuello (17-28%)^{30, 251, 284}. La presencia de lesiones en zonas cubiertas como nalgas, mucosas o zonas acras es un evento más infrecuente. En nuestra serie obtuvimos resultados algo distintos siendo la localización más frecuente en extremidades (55%), mientras que en tronco y cabeza/cuello alcanzó un porcentaje inferior (45% y 15% respectivamente). Este mayor porcentaje podría deberse a una frecuencia discretamente superior de mujeres en la muestra, ya que en el sexo femenino se ha descrito una afectación en MMII más elevada.

Respecto a la relación entre la mutación BRAF^{V600E} y la localización anatómica, algunos estudios encuentran una asociación significativa con la localización en tronco indicando que la presencia en cabeza y cuello podría ser un factor protector^{30, 40, 45, 83, 99, 100, 100, 101, 282, 285, 285, 291}. Otros estudios^{58, 251, 268, 289} en cambio no han mostrado asociación con la localización. Nuestro estudio no ha encontrado una asociación significativa con la localización, aunque sí ha evidenciado una frecuencia claramente superior de pacientes con melanoma en tronco (64.7% frente a 35.7%) y extremidades (58.2% frente a 41.8%) portadores de la mutación. De los localizados en cabeza y cuello, sólo uno de ellos era un LMM, siendo 10 casos MES y 4 casos MN, cabe esperar por tanto que en nuestra muestra la frecuencia de la mutación en cabeza y cuello sea superior a lo habitual.

En los resultados del estudio destaca también la presencia de 6 melanomas de localización sacra, todos ellos portadores de la mutación. Esta característica no ha sido descrita hasta el momento actual en la literatura científica. Cabe plantearse si la localización sacra sería una variable predictiva de la presencia de la mutación, aunque dado el bajo tamaño muestral en nuestra muestra no podemos afirmarlo con seguridad. Será preciso ampliar con futuros estudios este nuevo hallazgo.

Múltiples nevus, síndrome del nevus displásico y antecedentes de melanoma

Estudios previos han establecido que la presencia de múltiples nevus es un factor de riesgo en el desarrollo de melanomas cutáneos en tronco²⁹⁷⁻³⁰⁰. Podría plantearse por tanto, que los melanomas de los pacientes con múltiples nevus presentasen una mayor frecuencia mutaciones en BRAF. Llamativamente, son varios los estudios que no encuentran asociación entre la presencia de múltiples nevus y melanomas portadores de la mutación^{58, 285}, aunque los resultados son dispares encontrando otros estudios una asociación significativa^{38, 60, 101, 290, 291}. En nuestra población no se ha encontrado significación ni con la presencia de múltiples nevus ni con nevus displásicos. Recientemente se ha evidenciado que los nevus de pacientes con síndrome del nevus displásico no son portadores de la mutación somática³⁰¹ ni germinal³⁰² en BRAF, por lo que cabe esperar que los melanomas desarrollados sobre nevus en estos pacientes tampoco se encuentren mutados.

La asociación de la mutación con la presencia de un segundo melanoma sólo ha podido ser establecida en un estudio que agrupaba 100 pacientes con melanoma múltiple²⁷¹. Por el momento en la mayor parte de las series no se ha demostrado ni la relación con melanoma múltiple ni con antecedentes familiares de melanoma^{58, 285}. En nuestro estudio de los ocho pacientes con melanomas múltiples la mitad eran portadores de la mutación, mientras que en los pacientes con antecedente familiar de melanoma un 62.5% eran portadores de la mutación. En cualquier caso, la baja frecuencia de melanomas múltiples o antecedentes familiares de melanoma no permitió obtener resultados significativos.

Metástasis y estadio tumoral

La mutación activadora BRAF se ha correlacionado en algunos estudios con un curso más agresivo de la enfermedad y ha mostrado una cierta relevancia en la progresión⁵⁸. Recientemente, algunos autores han relacionado la presencia de esta mutación en el tumor primario con una mayor incidencia de metástasis ganglionares^{100, 251}. Broekaert, Bastian y colaboradores¹⁰⁰ encuentran una

asociación significativa con la presencia de metástasis ganglionares (n=44) mientras que Shinozaki y cols²⁵¹ hallan también una frecuencia mayor de este tipo de metástasis aunque no de forma significativa en un estudio con un bajo tamaño muestral (n=12). En nuestro estudio que presenta un tamaño muestral superior (n=52) sí hemos podido objetivar una asociación significativa (OR 2.24 IC95% 1.15-4.38 p=0.018) con la presencia de metástasis ganglionares. Esta asociación indicaría una mayor capacidad de invasión linfática de estos tumores y por tanto una predilección por esta vía de diseminación en los tumores portadores de la mutación BRAF^{V600E}. Dicha hipótesis va en consonancia con nuestros resultados que muestran una mayor invasión perivascular en los tumores primarios BRAF^{V600E}.

En lo que respecta a otras metástasis (hematógenas, partes blandas, en tránsito, satelitosis y ganglionares a distancia) no hemos hallado una asociación significativa. Revisando la literatura, los resultados de asociación de estas metástasis son más controvertidos: algunos autores encuentran una mayor incidencia de metástasis hepáticas²⁶⁸, otros una mayor frecuencia de lesiones “a distancia” aunque no de forma significativa²⁹⁰, otros contrariamente una menor incidencia de metástasis hematológicas y de localizaciones no linfáticas¹⁰⁰, pero la mayor parte de los estudios evidencian la misma ausencia de asociación^{270, 289} hallada por nosotros.

Resulta además llamativo que, en la mayoría de las publicaciones, el estadio tumoral de la AJCC no ha evidenciado una asociación estadísticamente significativa con la mutación^{58, 251, 270, 289, 303}, incluso a pesar de encontrar asociación con la presencia de metástasis ganglionares¹⁰⁰. Aunque algunos estudios sí encuentran una asociación significativa con estadios avanzados (III-IV) con hasta un 37% de los tumores mutados²⁸⁴, debe tenerse en cuenta que muchos de ellos no hacen un análisis multivariante ajustando por otros factores de mal pronóstico (como la ulceración o el índice de Breslow)²⁸⁸ y que incluso utilizan variables surrogadas asumiendo la presencia de la mutación⁹⁹. En el meta-análisis de Lee y colaboradores³⁰ no encuentran asociación significativa con la estadificación T correspondiente al TNM, pero no analizan los estadios de la AJCC. En nuestro estudio, el estadio II de la AJCC se encuentra asociado significativamente con la ausencia de mutación. Llama además la atención la elevada frecuencia de tumores portadores de la mutación en estadio I (66.7% mutados) y estadio III (65.9% mutados) frente a otros estadios (41.5% y 53.8% en II y IV respectivamente). Dado que se ha demostrado que los pacientes en estadio IIB y IIC tienen peor pronóstico que los pacientes en estadio IIIA y IIIB³⁰⁴, esto podría explicar cómo a pesar de una mayor tendencia a desarrollar metástasis ganglionares, el pronóstico de los pacientes portadores de la mutación podría ser más favorable.

Nuestros resultados apoyan por tanto la evidencia actual de una mayor capacidad de desarrollo de metástasis linfáticas en tumores primarios portadores de la mutación BRAF^{V600E}, sin que haya una clara asociación con otro tipo de metástasis.

3. VALOR PRONÓSTICO DE LA MUTACIÓN: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD, SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA Y SUPERVIVENCIA GLOBAL.

La mayor frecuencia de metástasis ganglionares en tumores portadores de la mutación hace surgir la pregunta de si esta mutación puede tener un impacto en el pronóstico de la enfermedad. Esta determinación implica una gran relevancia clínica pues si la presencia de la mutación conllevase un peor pronóstico, sería un argumento que apoyaría la necesidad de tratamiento adyuvante en estos pacientes.

A este respecto, son varios los estudios que han mostrado los mismos resultados que nuestro análisis, con una ausencia de correlación significativa con el impacto en la supervivencia global^{40, 100, 101, 251, 268, 288, 290, 305} y la supervivencia libre de progresión^{58, 100, 101, 251, 268, 290}, incluso a pesar de haberse correlacionado la mutación con una mayor incidencia de metástasis en alguno de ellos^{100, 268, 290}. Ningún estudio analiza sin embargo la supervivencia específica por melanoma. Recientemente, Long y colaboradores han mostrado la presencia de una menor SG, aunque sólo en el subgrupo de pacientes en estadio IV portadores de la mutación, sin impacto en la SLP. Este hallazgo sorprende, dado que la mayor parte de los tumores no portadores de la mutación en BRAF sí son portadores de mutaciones en NRAS, sobre todo teniendo en cuenta que esta mutación sí ha mostrado un impacto negativo en la supervivencia global^{306, 307}. Sería interesante analizar la muestra no mutada de estos autores y ver si se trata de tumores portadores en NRAS o no portadores de ninguna de ambas mutaciones.

Nagore y cols³⁰⁸ en una muestra de 147 pacientes en estadio I y II de la AJCC, encuentran una menor SLP en pacientes portadores de la mutación (HR 2.2 IC 95% 1.1-4.3) tras un seguimiento medio de 48 meses, aunque sin afectar a la SG. Kumar y colaboradores³⁰⁹ hallan una asociación significativa de la mutación en el tumor primario con una duración de respuesta más corta a tratamientos de quimioterapia combinada con IFN. Houben y colaboradores³¹⁰ no encuentran impacto en la SG de la mutación en el tumor primario pero sí en el desarrollo de metástasis (mayoritariamente metástasis en partes blandas). Moreau y colaboradores²⁷⁰ estudian la

mutación V600, no en los tumores primarios, sino en ganglios metastásicos de pacientes en estadio III de la AJCC hallando una mayor mortalidad en aquellos que presentaban la mutación (83% frente al 60% en metástasis BRAF^{WT}) con una menor SG (1.4 frente a 2.8 años en metástasis BRAF^{WT}). Las dos variables que mostraron de forma significativa ser un factor de riesgo para el desarrollo de metástasis a distancia y una menor SG fueron el número de ganglios afectados y la presencia de la mutación BRAF^{V600} en la metástasis ganglionar. Este estudio incluye a pacientes en tratamiento con ipilimumab y vacunas, aunque se aclara que los pacientes incluidos no mostraron respuesta al tratamiento. Además, en aquellos pacientes que iniciaron tratamiento con inhibidores de BRAF se paró su seguimiento y por tanto no se mostró el seguimiento real en muchos casos portadores de la mutación. Se excluyeron también a aquellos pacientes con metástasis ganglionares <2 mm por considerar que pudiesen dar errores en la determinación de la mutación, seleccionando así un grupo de pacientes con peor pronóstico.

En nuestro estudio (que no incluía ningún paciente tratado con BRAFi y en el que se excluyó a los pacientes tratados con ipilimumab del análisis) tanto la mortalidad general como la específica atribuible a muerte por melanoma no muestran una asociación significativa con la presencia de la mutación en el tumor primario, en las metástasis ganglionares ni en el resto de metástasis. La media de SG, SE y SLP es, en cambio, más prolongada para aquellos pacientes portadores de la mutación tanto en el tumor primario como en las metástasis (incluyendo el subanálisis en metástasis ganglionares). Se objetiva también una mayor tendencia de los pacientes portadores de la mutación a presentar metástasis ganglionares (67.2%), en tránsito (66.7%) y satelitosis (62.5%) frente a aquellos no portadores (47.7%, 54% y 53.4% respectivamente). En cambio aquellos tumores no portadores de la mutación presentan con mayor frecuencia metástasis hematógenas (57.7%) y ganglionares a distancia (56.3%) frente a los tumores mutados (48.5% y 40% respectivamente). Por otro lado, la SG en pacientes con metástasis ganglionares, satelitosis y en tránsito (estadio III de la AJCC) se ha reportado de hasta un 23-85% a 5 años, mientras que en el estadio IV (metástasis hematógenas y a distancia) el pronóstico es poco alentador con una SG de entre 8-18 meses^{1, 311}. Dado que los pacientes con metástasis hematógenas y ganglionares a distancia presentan un peor pronóstico que aquellos con metástasis ganglionares, esto explicaría por qué los pacientes con tumores BRAF^M presentan una mayor supervivencia frente a aquellos portadores de lesiones no mutadas.

4. ASOCIACIÓN CON VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS

El análisis de las variables histopatológicas en nuestro estudio ha mostrado una asociación significativa de la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario con el subtipo histológico, la consumición epidérmica y la invasión perivascular. La necrosis y la afectación extracapsular se han mostrado por otro lado factores de riesgo para la presencia de la mutación en la metástasis ganglionar.

4.1. Asociación con variables histopatológicas en el tumor primario

Subtipo histológico

Nuestros hallazgos de una asociación significativa con el subtipo MES van en consonancia con los publicados por la mayor parte de los estudios, incluyendo dos recientes meta-análisis^{30, 284}. En todos ellos encuentran una asociación significativa de la presencia de la mutación en BRAF con patrón histológico de melanoma de extensión superficial, estando presente en un 49-50.4% de los casos (OR 2.021 95% IC 1.440-2.835 p<0.001)^{30, 38, 45, 58, 83, 99-101, 270, 271, 284, 285, 291, 312, 313}. Son pocos los estudios que no hallan significación estadística a este respecto²⁸⁹.

La presencia de BRAF^{V600} en el subtipo LMM (22%) o MLA (15-20%) es poco frecuente^{2, 30, 45, 284} según estos autores. En nuestro estudio encontramos resultados similares en MLA con una frecuencia de tumores mutados de un 20%. En el caso del LMM, sólo un tumor de toda la muestra pertenecía a este subtipo, siendo no portador de la mutación BRAF^{V600E}. La asociación con el patrón tipo MN se ha objetivado en algunos estudios^{58, 101, 271}, aunque la mayor parte de los autores refieren una distribución heterogénea de la mutación. Dos meta-análisis recientes muestran una frecuencia de hasta un 41% aunque sin asociación estadísticamente significativa^{30, 284}. Nuestros resultados muestran una frecuencia superior, alcanzando el 53.1% de tumores mutados con significación estadística en el estudio multivariante (p=0.015). Esto puede deberse a que, tal y como proponen algunos autores¹⁰⁰, el subtipo MN sea una progresión acelerada de los otros subtipos y la frecuencia elevada de MN mutados sea un reflejo de la elevada frecuencia de la mutación en la muestra de nuestro estudio.

Consumición epidérmica e invasión perivascular

La consumición epidérmica es una característica histopatológica recientemente descrita. Se le ha atribuido relación con una mayor ulceración y tasa de proliferación celular en melanoma³¹⁴. Algunos autores incluso la han propuesto como una característica distintiva entre nevus y melanoma³¹⁵. Se trata de una variable no recogida hasta ahora en estudios referidos a la mutación BRAF en melanoma. Nuestros resultados encuentran una asociación significativa con la consumición epidérmica (OR 3.06 IC 95% 1.54-6.05 p=0.001), perdiendo potencia esta asociación en el estudio multivariante. El hallazgo de una asociación significativa de la consumición epidérmica con tumores BRAF mutados no había sido estudiado hasta ahora, por lo que esta posible asociación abre una nueva línea de investigación en este campo.

La invasión perivascular ha mostrado asociación significativa con tumores portadores de la mutación en nuestro estudio (OR 2.01 IC 95% 1.02-3.95 p=0.044), perdiendo también potencia dicha asociación en el estudio multivariante aunque manteniéndose con valores de p<0.1. La limitación de este hallazgo radica en la no utilización de técnicas inmunohistoquímicas para su valoración. La presencia de invasión linfovascular se ha asociado a una mayor tasa de metástasis ganglionares³¹⁶, aunque esta mayor asociación no ha sido estudiada sin embargo con la invasión perivascular. Aún así, la asociación significativa de esta variable, no descrita hasta el momento actual, podría explicar la mayor tendencia a desarrollar metástasis linfáticas por parte de estos melanomas.

Índice de Breslow y nivel de Clark

Nuestros hallazgos no muestran asociación de la mutación con el índice de Breslow. Aunque en dos estudios la presencia de la mutación se objetivó con mayor frecuencia en melanomas invasores (29-50%) que en melanomas in situ (5.6-10%)^{38, 62} cabe destacar que, dentro de los melanomas invasores, son varios los autores que asocian la presencia de la mutación con un menor grosor tumoral (<1mm) y su ausencia en tumores gruesos (>4mm)^{30, 285}. A pesar de ello, la mayor parte de las publicaciones^{38, 58, 59, 268, 270, 284, 288, 289, 303, 317}, incluyendo nuestro estudio y dos recientes meta-análisis^{30, 284} no encuentran una asociación significativa. Esto podría deberse a que el grupo de los melanomas in situ estudiados estuviese constituido fundamentalmente por lesiones tipo léntigo melanoma. También podría influir que el subtipo MES (que presenta con mayor frecuencia la mutación) suela asociarse con grosores menores que MLA y MN. Resultados similares se han objetivado con NRAS, ya que aunque estudios iniciales también le atribuían una

asociación con un mayor grosor tumoral²⁸⁸, estudios posteriores con mayor tamaño muestral han mostrado la ausencia de asociación^{38, 40, 318}.

El nivel de Clark no se ha asociado significativamente con la mutación en el tumor primario en nuestro estudio. Son pocos los estudios que valoran esta asociación. Ellerhorst y cols²⁸⁸ encuentran asociación entre la presencia de mutación en BRAF y NRAS con niveles Clark más profundos, aunque en dicho análisis los resultados atribuibles a BRAF quedan alterados por el análisis conjunto con NRAS.

Ulceración e índice mitótico

Al igual que en nuestro análisis, la mayor parte de los estudios, incluyendo un reciente meta-análisis²⁸⁴, tampoco encuentren significación al valorar la asociación de la mutación en el tumor primario con la ulceración histológica^{38, 40, 58, 270, 285, 289, 317}. Sólo dos autores^{288, 303} encuentran asociación con la ulceración, siendo uno de los estudios llevado a cabo en población asiática con una elevada frecuencia (62%) de melanomas mucosos y MLA, lo que podría condicionar una mayor frecuencia de tumores ulcerados en la muestra.

El índice mitótico ha sido poco estudiado en las distintas publicaciones y con resultados dispares. Algunos de los autores encuentran resultados similares a nuestro estudio, sin significación estadística^{270, 288, 317}. Otros en cambio encuentran una asociación significativa con una menor tasa de mitosis²⁸⁵. Finalmente otros autores sí encuentran significación con la presencia de mitosis⁵⁸. En nuestro estudio ausencia de mitosis atípicas se asoció con la presencia de la mutación (OR 0.47 IC 95% 0.20-1.12 p=0.087) con valores próximos a la significación aunque sin alcanzarla. No evidenciamos en cambio asociación con la presencia de mitosis o el índice mitótico.

Pigmentación

Los tumores portadores de la mutación BRAF^{V600E} en nuestro estudio son con mayor frecuencia lesiones pigmentadas mientras que los tumores no mutados son más frecuentemente no pigmentados. Dicha asociación con la pigmentación, tanto macroscópica²⁸⁵ como microscópicamente^{99, 100}, ya ha sido descrita en publicaciones previas aunque en nuestro estudio no alcanzó significación estadística (OR 2.07 IC 95% 0.95-4.50 p=0'067). La pigmentación en el melanoma depende de la melanina, cuya producción se encuentra regulada por la tirosinasa que a su vez es controlada por el MITF. Recientemente se ha mostrado que la transcripción, función y degradación del MITF se regula parcialmente por la vía de las MAPK^{319, 320}. Dicha mayor

pigmentación podría deberse a la disregulación del MITF secundaria a una activación constitutiva de esta vía.

Otras variables histopatológicas

Dado que la mutación está presente en hasta un 89% de nevos benignos^{38, 41, 66}, cabría esperar una asociación significativa con la presencia histológica de nevos previo. Sin embargo esta asociación no ha sido evidenciada en nuestro estudio ni en otros publicados^{58, 101}. Por otro lado, la mayoría de los melanomas se inician *de novo* y no sobre una lesión névica preexistente. Algunas publicaciones sí encuentran una mayor frecuencia con la coexistencia histológica de una lesión névica^{38, 40}. A pesar de ello, cabe destacar que la mayoría de los autores coinciden en que no todos los melanomas desarrollados sobre nevos son portadores de la mutación^{38, 101}.

La celularidad predominante en melanomas portadores de BRAF^{V600E} en nuestro estudio es de tipo epitelioide sin alcanzar (aunque próxima) la significación en la regresión logística (OR 4.01 IC 95% 1.54-10.48 p=0.005) aunque perdiéndose significación en el estudio multivariante. El epidermotropismo y la extensión pagetoide, al igual que sucedía con la pigmentación, se muestran como factores asociados también próximos a la significación con valores de p<0.1 (OR 1.81 IC 95% 0.90-3.64 p=0.096 y OR 2.09 IC 95% 0.91-4.79 p=0.082 respectivamente). Estas tres características han sido descritas también por Viros y cols⁹⁹ asociadas a la mutación BRAF. La presencia de micronódulos aparece también como un posible factor asociado a la mutación (OR 2.31 IC 95% 0.90-5.97 p=0.083). Aunque evidenciamos una asociación con la celularidad epitelioide, el epidermotropismo, la extensión pagetoide y la presencia de micronódulos, no podemos validar esta afirmación al no alcanzar estos parámetros significación estadística.

Otras variables como el infiltrado inflamatorio se han asociado con la mutación en otros estudios⁴⁰, no así en nuestros resultados. La asociación de la mutación con la fase de crecimiento, la necrosis, la atipia citológica, las satelitosis microscópicas, la discohesión, el subtipo polipoide y la regresión no habían sido estudiadas hasta el momento actual, pero no muestran asociación en nuestros resultados.

4.2. Asociación con variables histopatológicas en la metástasis ganglionar

Sólo un estudio publicado hasta el momento por Moreau y cols²⁷⁰ que analiza las características histopatológicas de las metástasis ganglionares y lo comparan con la presencia de la mutación en la lesión metastásica. Este estudio encuentra una mayor frecuencia de afectación extracapsular

(85.7%) en tumores BRAF^M aunque sin alcanzar significación estadística. No encuentra asociación con la extensión de la metástasis, subdividiéndolas en macro y micrometástasis, no analizando en el tipo de metástasis o la necrosis.

En consonancia con sus resultados, encontramos una mayor frecuencia de extensión extracapsular de las metástasis, con una asociación significativa (OR 9.68 IC 95% 1.11-84.46 p=0.040), hallando también una asociación con la necrosis en la metástasis (OR 6.47 IC 95% 1.25-33.52 p=0.026). Al igual que en el estudio de Moreau y cols tampoco encontramos significación con la extensión de la metástasis, siendo nuestra descripción (masiva, subcapsular, intraparenquimatoso, subcapsular e intraparenquimatoso) más detallada al respecto. Nuestros resultados indican que la presencia de extensión extracapsular y la necrosis en metástasis ganglionares podrían ser una característica predictiva de la presencia de la mutación BRAF^{V600E}.

5. CONCORDANCIA MUTACIONAL ENTRE EL TUMOR PRIMARIO Y LAS METÁSTASIS.

Dado que la discordancia entre el estado mutacional del tumor primario y las metástasis, ya ha sido objetivada en otros tumores³²¹ y esta constituye una causa de resistencia al tratamiento, uno de los objetivos principales de nuestro estudio era valorar el grado de concordancia de la mutación BRAF^{V600E} entre tumores primarios y sus correspondientes metástasis. En el melanoma metastásico, el estudio de otras mutaciones como NRAS habían mostrado una concordancia elevada³¹⁸.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, realizados con RT-qPCR, inicialmente presentaban doce casos discordantes. De esos 12 casos, sólo en 6 se disponía de material suficiente para poder ser estudiados en otro centro mediante técnicas de secuenciación de Sanger e inmunohistoquímica VE1. En todos los casos estudiados mediante técnicas complementarios se observó concordancia entre el tumor primario y la metástasis. Analizando estos casos discordantes, objetivamos que ninguna de las metástasis se trataba de tumores muy pigmentados o eran portadores de la mutación BRAF^{V600K}. Sin embargo, la mayor parte de ellas presentaban un bajo porcentaje (<10%) de celularidad tumoral, motivo que podría explicar la negatividad inicial mediante RT-qPCR y la posterior positividad mediante inmunohistoquímica. Por tanto, la discordancia inicialmente obtenida fue menor tras emplear técnicas diagnósticas complementarias como la secuenciación o la inmunohistoquímica VE1, mostrando en este último caso mejores resultados especialmente en lesiones con baja carga tumoral. En el resto de casos

discordantes, dada la imposibilidad de realización de técnicas complementarias, no pudo descartarse que la discordancia se debiese a un fallo en la detección mediante RT-qPCR.

La tasa de concordancia global en nuestro estudio ascendió a un 90% de concordancia entre tumores primarios y sus correspondientes metástasis. Estos resultados se mantuvieron elevados tanto en metástasis ganglionares (88.2%), como hematógenas (100%) y en partes blandas (93%). Aunque globalmente son resultados sólidos de concordancia por el tamaño muestral, cabe destacar que en el subgrupo de las metástasis hematógenas se dispone de un bajo número de casos. Estudios previos con un menor tamaño muestral²⁵¹⁻²⁵³ habían obtenido resultados dispares, tal y como puede objetivarse en la tabla 21. Más recientemente, un estudio ya con una muestra considerable²⁵⁰ obtiene resultados globales similares con una elevada concordancia en metástasis linfáticas.

En nuestro estudio todos los casos discordantes se trataban de tumores primarios mutados (BRAF^M) con metástasis no portadoras de la mutación (BRAF^{WT}). Si revisamos las discordancias en los estudios publicados podemos objetivar también resultados dispares al respecto (Tabla 21):

- Colombino y colaboradores²⁵⁰ encuentran una baja tasa de discordancia (15 de 165 casos), siendo las lesiones discordantes un 53% tumores primarios BRAF^{WT} con metástasis BRAF^M y un 47% tumores primarios BRAF^M con metástasis BRAF^{WT}.
- Saroufim y colaboradores³⁰¹ estudian 40 muestras de tumores primarios y metástasis emparejadas, de las cuales sólo se dispone de tejido suficiente en 33. En 6 casos obtienen resultados no valorables con PCR por lo que recurren a la inmunohistoquímica. Objetivan una concordancia en 26 casos (79%), siendo los casos discordantes 5 tumores primarios BRAF^M con metástasis BRAF^{WT} y 2 primarios BRAF^{WT} con metástasis BRAF^M.
- Shinozaki y colaboradores²⁵¹ encuentran discordancia en 8 casos de 13 estudiados siendo todos los casos tumores primarios BRAF^{WT} que presentaban metástasis BRAF^M. Los autores indican que la presencia de la mutación podría adquirirse durante la progresión de la enfermedad.
- Lin y colaboradores²⁵² objetivaron discordancia en muestras de 3 pacientes en los que las poblaciones celulares BRAF^M en tumores primarios inicialmente heterogéneos se seleccionaban positivamente. Una de ellas se trataba de una recurrencia mutada en un paciente con un tumor primario originariamente no portador de la mutación. Otra de las muestras mostraba heterogeneidad tumoral en el tumor primario (BRAF^{WT} + BRAF^{V600K}) y una

predominancia de la mutación BRAF^{V600K} en 7 de las 9 metástasis viscerales y subcutáneas. Finalmente un tercer paciente con tumor primario portador de la mutación BRAF^{V600K} mostraba un mayor número de alelos mutados en la metástasis ganglionar. Apuntaban dichos autores que incluso en melanomas acrales y mucosos pueden hallarse pequeñas subpoblaciones minoritarias con mutación en BRAF en el tumor primario que posteriormente predominen en las metástasis.

- Houben y colaboradores³¹⁰ estudian NRAS y BRAF en una muestra de 24 metástasis emparejadas encontrando discordancia en 7 casos. En 3 casos se trata de tumores primarios BRAF^{WT} que presentan metástasis BRAF^M (V600E, V600R, V600K). Otros dos casos son tumores inicialmente mutados (BRAF^{V600E}) cuyas metástasis son BRAF^{WT}, pero adquieren mutaciones en NRAS que no estaban presentes en el tumor primario. El resto de los casos muestran discordancia mutacional exclusivamente en NRAS.
- Omholt y colaboradores³⁹ estudian BRAF en 71 melanomas primarios de los que en 51 casos pueden estudiarse metástasis emparejadas aunque sin no especifican el tipo de metástasis. Sólo 2 casos presentan discordancia siendo tumores primarios BRAF^{WT} con metástasis BRAF^M. En 17 casos estudian además metástasis consecutivas, encontrando sólo un caso discordante de un paciente con primario BRAF^M que desarrolló posteriormente una metástasis BRAF^M y otra BRAF^{WT}.
- Akslen y colaboradores³⁰⁵ estudian 18 casos, de ellos en 17 obtienen resultados mostrando sólo 2 casos discordantes siendo en ambos casos tumores primarios BRAF^{WT}.
- Yancovitz y colaboradores²⁵³ estudian la concordancia de BRAF en 18 tumores y sus correspondientes metástasis. De los ocho casos discordantes, seis son tumores BRAF^{WT} con metástasis BRAF^M, mientras que dos son tumores BRAF^M con metástasis BRAF^{WT}.
- Busam y colaboradores³²² realizan un estudio con muestras de pacientes con estado mutacional ya conocido por secuenciación en las que valoran los resultados de la tinción inmunohistoquímica VE1. Entre los casos se encuentra un tumor primario BRAF^M en el que se valora su correspondiente metástasis, que muestra concordancia.

Son varios los estudios en los que no se dispone del tumor primario pero sí de varias metástasis de un mismo paciente para analizar la concordancia. Un estudio interesante es el de Sigalotti y colaboradores³²³ que analiza metástasis iniciales (n=15) y subsecuentes (n=19) de 15 pacientes. Encuentran que en todos los casos se mantenía el estado mutacional de BRAF (3 BRAF^{WT} y 12 BRAF^M), siendo la única variación objetivada la adquisición en dos casos de un estatus homocigoto en las metástasis subsecuentes originadas por lesiones primarias heterocigotas. Este estudio

sugiere la estabilidad del estado mutacional del melanoma tras haber alcanzado el estado metastásico, independientemente de la localización o intervalo de tiempo transcurrido³²³. Siguiendo esta línea, Saroufim y colaboradores³⁰¹ hallan un 100% de concordancia en 6 pacientes

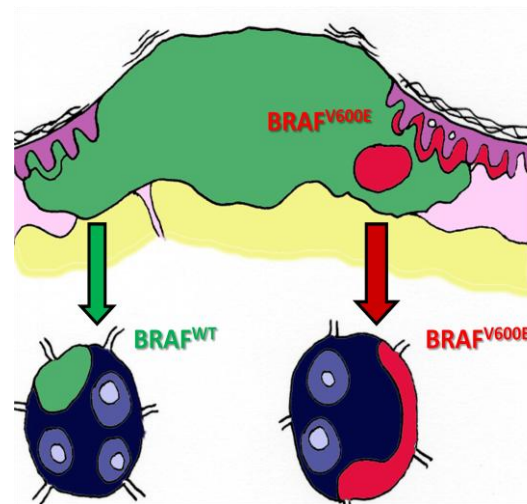
	N prim		Linfáticas		P. blandas		Hematógenas		Método		Discordantes			
	N	met	N	Conc	N	Conc	N	Conc	Disc	Disc				
Godoy y cols ²⁵⁰	152	70	51	45 (88%)	6 (12%)	15	14 (93%)	1 (7%)	4	4 (100%)	0	PCR + IH + S	BRAF ^M	
Colombino y cols ²⁵⁰	102	165	84	78 (93%)	6 (7%)	36	29 (81%)	7 (19%)	45	43 (96%)	2 (4%)	S	BRAF ^M / BRAF ^{WT}	
Saroufim y cols ²⁵¹	33	33	22	20 (91%)	2 (9%)	7	4 (57%)	3 (43%)	4	2 (50%)	2 (50%)	PCR+IH	BRAF ^M / BRAF ^{WT}	
Shinozaki y cols ²⁵¹	13	13	12	7 (58%)	5 (42%)				1	1 (100%)	0	S	BRAF ^{WT}	
Lin y cols ²⁵²	2	10	5	2 (40%)	3 (60%)	2	0 (0%)	2 (100%)	3	1 (33%)	2 (67%)	S	BRAF ^M / BRAF ^{WT}	
			No especificadas											
Houben y cols ³¹⁰	24	24*		19 (79%)	5 (21%)							S	BRAF ^M / BRAF ^{WT}	
Omholt y cols ³⁹	51	88*		49 (96%)	2 (4%)							S	BRAF ^{WT}	
Akslen y cols ³⁰⁵	17	17*		15 (88%)	2 (12 %)							S	BRAF ^{WT}	
Yancovitz y cols ²⁵³	18	18*		10 (56%)	8 (44%)							S+PCR	BRAF ^M / BRAF ^{WT}	
Busam y cols ³²²	1	1*		1 (100%)	0							S+IH	-	

Tabla.22.-Concordancia de la mutación BRAF^{v600} en tumor primario y metastásico, publicaciones previas. Se indican en primer lugar aquellos autores que especifican el tipo de metástasis y en segundo lugar aquellos que incluyen metástasis no especificadas. Conc= concordancia; Disc=discordancia. IH= inmunohistoquímica; S=secuenciación Sanger; *= no especificada ubicación de las metástasis.

con metástasis subsecuentes y Niessner y colaboradores³²⁴ objetivan en un estudio con muestras de metástasis cerebrales y extracerebrales emparejadas, un patrón idéntico en BRAF, NRAS y KIT. En contraposición, Chang y colaboradores²⁶⁸ analizan en su estudio 3 casos con metástasis múltiples en tejido criopreservado mediante secuenciación, encontrando concordancia completa en 1 de ellos, mientras que en los otros 2 casos encuentran metástasis discordantes.

La discordancia entre tumores primarios y sus correspondientes metástasis podría explicarse basándose en una reciente teoría propuesta por Yancovitz y colaboradores²⁵³ según la cual en el melanoma existen subclones de distintas poblaciones dentro del mismo tumor, la llamada heterogeneidad intratumoral. Estos autores estudian muestras de 73 pacientes, aunque sólo en 18 casos se corresponden con lesiones primarias y metastásicas del mismo paciente. En 6 de los 9 tumores primarios estudiados se observó heterogeneidad intratumoral en el estado mutacional de las poblaciones celulares. Diversos estudios han objetivado también este fenómeno en metástasis de un mismo paciente^{40, 268}.

Fig.47.-Heterogeneidad intratumoral. Presencia de subclones portadores de la mutación BRAF^{V600E} en un tumor primario mayoritariamente BRAF^{WT}.



La existencia de estas distintas poblaciones celulares, unas portadoras de la mutación y otras no, permitiría el desarrollo tanto de metástasis BRAF^M como BRAF^{WT}. Del mismo modo, la presencia de heterogeneidad intratumoral (subclones distintos en un mismo tumor) e intertumoral (entre lesiones primarias y sus metástasis) podrían explicar la resistencia a las terapias dirigidas y la progresión tras una buena respuesta inicial al tratamiento con BRAFi en algunos pacientes por selección clonal. Nuestro estudio demuestra además que las lesiones mutadas presentan una mayor tendencia a desarrollar metástasis ganglionares, queda por dilucidar cuál sería el mecanismo por el que se produce esta diseminación.

La discordancia objetivada en nuestro análisis es baja (10%) y no puede descartarse que parte de ella se deba a un fallo para la detección de la mutación mediante RT-qPCR. En cualquier caso el porcentaje no es despreciable teniendo en cuenta que todos los casos discordantes se trataba de

pacientes que podrían beneficiarse de tratamiento con BRAFi y la no detección de la mutación supondría negarles dicha opción terapéutica. Parece por tanto lógico proponer que el tejido idóneo para el análisis de la mutación sea el tejido metastásico disponible más reciente, siempre que se disponga de una cantidad adecuada. Cuando no se disponga de acceso a dicho tejido metastásico, la elevada concordancia de nuestros resultados nos indica que sería correcto el estudio del tumor primario en su lugar. Del mismo modo, ante una progresión durante tratamiento con BRAFi, parece lógico analizar las nuevas metástasis valorando la posible progresión por parte de clones no portadores de la mutación.

Respecto a la técnica más idónea para el análisis de la mutación, la RT-qPCR se encuentra actualmente validada por la FDA y la EMEA para el estudio previo al tratamiento con BRAFi. Es una técnica con una buena sensibilidad y especificidad, con buenos resultados tal y como hemos podido comprobar en nuestro análisis, además se encuentra disponible en muchos centros y es ofrecida de forma gratuita por la plataforma BRIGHT (www.biomarkerpoint.com) para aquellos pacientes candidatos al tratamiento en cuyos hospitales no dispongan de ella.

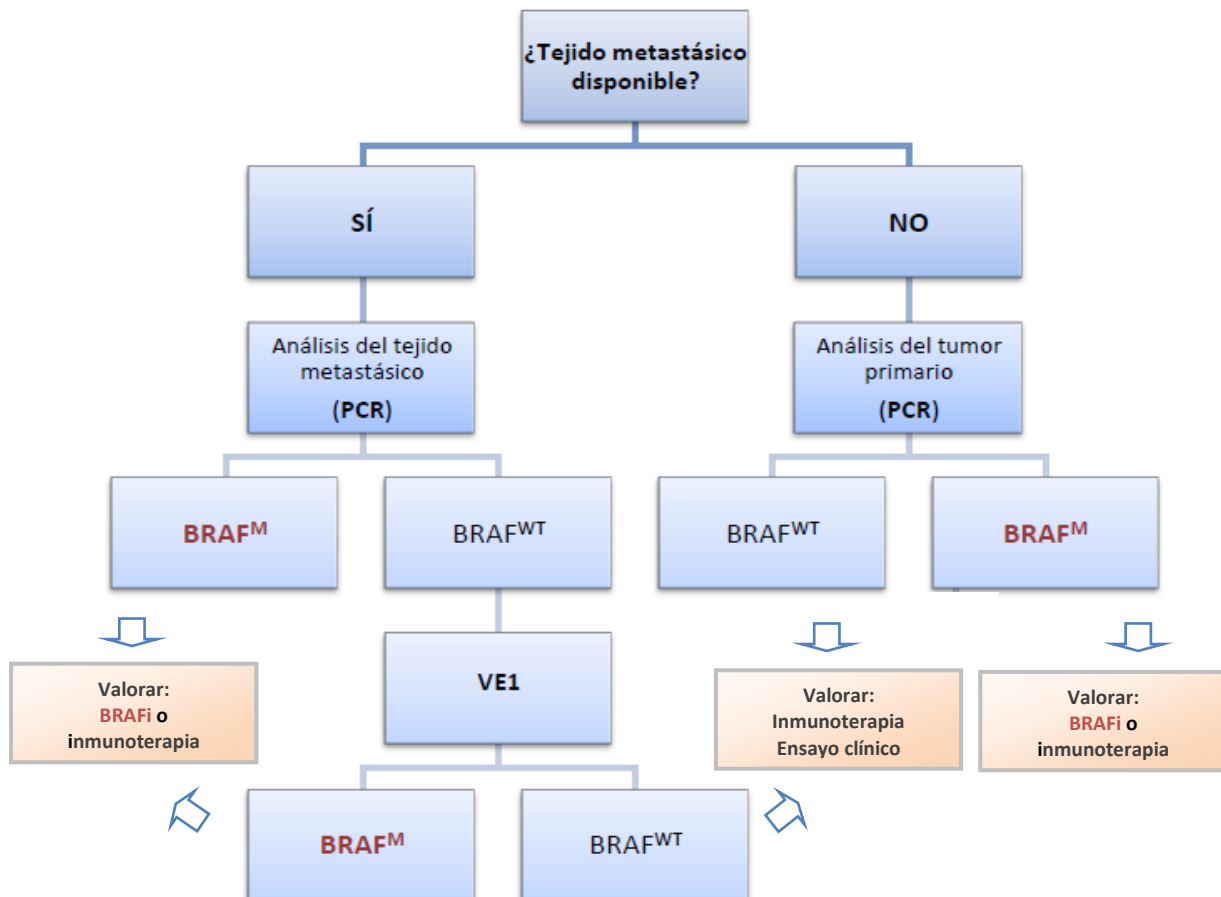


Fig.48.- Algoritmo propuesto para la determinación del estado mutacional de BRAF.

Analizando los falsos negativos en nuestro estudio, todos presentaban un porcentaje de tejido tumoral inferior al 5-10%. En estos casos con baja carga tumoral, la inmunohistoquímica con VE1 resulta de especial utilidad. La tinción inmunohistoquímica es además una técnica ya empleada habitualmente en los laboratorios de Anatomía Patológica de la mayor parte de los hospitales y por tanto más accesible en la práctica clínica. Nos parece por ello un método idóneo para complementar el estudio de la mutación BRAF^{V600E} en aquellos casos inicialmente discordantes o dudosos, especialmente en aquellos cuyas características clínico-patológicas sugieran la presencia de la mutación. Proponemos por tanto un algoritmo diagnóstico para la detección de la mutación en pacientes con melanoma metastásico (Fig.47).

La utilización de inhibidores de BRAF como tratamiento del melanoma metastásico se ha realizado hasta hace poco asumiendo que el estado mutacional de los tumores metastásicos se correlaciona con el de los tumores primarios que los generan. La heterogeneidad intratumoral y los estudios de concordancia entre los que destaca nuestro estudio por su tamaño muestral, hacen evidente que existe una baja discordancia entre los tumores primarios y sus metástasis. La necesidad de un consenso en las guías sobre el tejido tumoral más adecuado para determinar el estado mutacional en el melanoma metastásico, la posibilidad de que pacientes portadores de la mutación no se beneficien de las terapias dirigidas por una detección inadecuada, así como la consideración de la aparición de resistencias a estos tratamientos por la presencia de discordancia mutacional hacen fundamental la determinación del tejido idóneo para la detección de la mutación en BRAF. En esta línea de trabajo, los resultados de este estudio, coordinados con los de otros estudios realizados en distintos centros españoles han permitido elaborar las guías actuales de consenso⁶². Del mismo modo, la existencia de variables clínico-patológicas tanto en el tumor primario como en las metástasis con una correlación significativa con la presencia de BRAF^{V600E} como las demostradas en el presente trabajo, hace que puedan utilizarse como factores predictivos de la presencia de la mutación. Esta nueva información genética permitirá integrar estos parámetros en futuras clasificaciones del melanoma cutáneo. Las clasificaciones serán así no sólo con información clínica y anatomopatológica, sino también con una implicación pronóstica y terapéutica. Así mismo, la mejor comprensión de las alteraciones moleculares en esta enfermedad, permitirán el desarrollo de herramientas terapéuticas cada vez más efectivas para nuestros pacientes.

V. CONCLUSIONES

- 1) La frecuencia de la mutación BRAF^{V600E} en melanomas malignos invasivos diagnosticados en diferentes hospitales de Castilla y León es del 55'9%. Su frecuencia en las metástasis ganglionares, de partes blandas y hematógenas es del 52'9%, 66'7%, y 50% respectivamente. Se trata de tasas discretamente superiores a lo descrito en la literatura.

- 2) Las variables clínicas que se asocian significativamente a la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario son el patrón de exposición solar intermitente y la presencia de metástasis ganglionares.

- 3) Las variables anatomopatológicas que se asocian significativamente con la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario son el subtipo melanoma de extensión superficial, la consumición epidérmica, la invasión linfovascular y la celularidad epitelioides. La presencia de necrosis y/o extensión extracapsular se asocian de forma significativa con la presencia de la mutación BRAF^{V600E} en la metástasis ganglionar.

El subtipo melanoma nodular, el epidermotropismo, la pigmentación, los micronódulos, el patrón pagetoide y la ausencia de mitosis atípicas son factores histopatológicos asociados a la mutación BRAF^{V600E} en el tumor primario, con una asociación próxima a la significación estadística aunque sin alcanzarla.

- 4) Los pacientes con melanomas portadores de la mutación BRAF^{V600E} presentan una mayor supervivencia global, supervivencia específica por melanoma y supervivencia libre de progresión, aunque dicha asociación no muestra significación estadística.

- 5) En los casos estudiados hasta la fecha existe una alta correlación (al menos del 90%) en el estado mutacional de BRAF^{V600E} entre los melanomas primarios y sus correspondientes metástasis. Todos los casos discordantes son lesiones metastásicas en las que no se disponía de tejido tumoral suficiente para el estudio mediante técnicas adicionales a la RT-qPCR, a pesar de ello la tasa de discordancia es baja (10%).

- 6) En base a nuestros resultados, proponemos un protocolo de identificación de la mutación BRAF^{V600E} según el cual, se realizaría inicialmente la determinación mediante RT-qPCR en la muestra de tejido tumoral metastásico más reciente. Cuando dicha determinación sea negativa, la muestra deberá ser reevaluada mediante otras técnicas antes de rechazar al paciente como candidato a tratamiento con BRAFi. La tinción inmunohistoquímica VE-1 se postula como la técnica complementaria ideal, especialmente en lesiones con baja carga tumoral, dada su alta sensibilidad y que los estudios inmunohistoquímicos están implantados ya en la mayor parte de los hospitales. En aquellos pacientes en los que no se disponga de tejido tumoral metastásico podrá utilizarse el tumor primario para la determinación de la mutación.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27(36):6199-6206.
2. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-954.
3. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(9):809-819.
4. Fuente:<https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/MELANOMA/Paginas/incidencia.aspx>. 2012
5. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355(1):51-65.
6. Siegel R, DeSantis C, Virgo K et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(4):220-241.
7. Saenz S, Conejo-Mir J, Cayuela A. [Melanoma epidemiology in Spain]. *Actas Dermosifiliogr* 2005;96(7):411-418.
8. Rios L, Nagore E, Lopez JL et al. Melanoma characteristics at diagnosis from the Spanish National Cutaneous Melanoma Registry: 15 years of experience. *Actas Dermosifiliogr* 2013;104(9):789-799.
9. Fuente:<http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/104018-el-cancer-en-espana-2013>. 2013
10. Saenz S, Conejo-Mir J, Cayuela A. Melanoma epidemiology in Spain. *Actas Dermosifiliogr* 2005;96(7):411-418.
11. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 3:iii14-iii20.
12. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000;25(6):459-463.
13. Marquez-Rodas I, Martín-González M, Nagore E et al. The FAM-GEM-1 study: frequency and characteristics of familial melanoma in Spain. *J Clin Oncol* 2014.
14. Martín-González M, Cerezuela P, Martín-Carnicero A et al. Familial Melanoma in Spain: Preliminary report of the FAM-GEM-1 study. *J Clin Oncol* 2013;31 suppl:abstr e20015.
15. Marquez-Rodas I, Martín-González M, Cerezuela P et al. Frequency and characteristics of familial melanoma in Spain: exploratory results of the FAM-GEM-1 study. *European Society Medical Oncology Amsterdam póster* 468 2013; .
16. Chirlaque MD, Salmeron D, Ardanaz E et al. Cancer survival in Spain: estimate for nine major cancers. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 3:iii21-iii29.
17. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-4689.

18. Monsel G, Ortonne N, Bagot M, Bensussan A, Dumaz N. c-Kit mutants require hypoxia-inducible factor 1alpha to transform melanocytes. *Oncogene* 2010;29(2):227-236.
19. Bardeesy N, Kim M, Xu J et al. Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol Cell Biol* 2005;25(10):4176-4188.
20. Furge KA, Kiewlich D, Le P et al. Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(19):10722-10727.
21. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005;386(3):193-205.
22. Weeraratna AT. RAF around the edges--the paradox of BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012;366(3):271-273.
23. Maurer G, Tarkowski B, Baccarini M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 2011;30(32):3477-3488.
24. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6(3):184-192.
25. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(12):988-1004.
26. Albino AP, Le SR, Oliff AI, Furth ME, Old LJ. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature* 1984;308(5954):69-72.
27. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 1989;4(11):1363-1374.
28. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(1):11-22.
29. Da Forno PD, Pringle JH, Fletcher A et al. BRAF, NRAS and HRAS mutations in spitzoid tumours and their possible pathogenetic significance. *Br J Dermatol* 2009;161(2):364-372.
30. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 2011;164(4):776-784.
31. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol* 1994;102(3):285-290.
32. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 2008;1(4):395-405.
33. Platz A, Ringborg U, Brahme EM, Lagerlof B. Melanoma metastases from patients with hereditary cutaneous malignant melanoma contain a high frequency of N-ras activating mutations. *Melanoma Res* 1994;4(3):169-177.

34. Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol* 2007;127(1):179-182.
35. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(27):6771-6790.
36. Fischer A, Hekman M, Kuhlmann J, Rubio I, Wiese S, Rapp UR. B- and C-RAF display essential differences in their binding to Ras: the isotype-specific N terminus of B-RAF facilitates Ras binding. *J Biol Chem* 2007;282(36):26503-26516.
37. Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):349-361.
38. Poynter JN, Elder JT, Fullen DR et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res* 2006;16(4):267-273.
39. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003;9(17):6483-6488.
40. Edlundh-Rose E, Egyhazi S, Omholt K et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 2006;16(6):471-478.
41. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33(1):19-20.
42. Jovanovic B, Egyhazi S, Eskandarpour M et al. Coexisting NRAS and BRAF mutations in primary familial melanomas with specific CDKN2A germline alterations. *J Invest Dermatol* 2010;130(2):618-620.
43. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003;22(20):3113-3122.
44. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004;122(2):337-341.
45. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353(20):2135-2147.
46. Smalley KS, Lioni M, Dalla PM et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* 2008;7(9):2876-2883.
47. Smalley KS, Contractor R, Nguyen TK et al. Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res* 2008;68(14):5743-5752.
48. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005;436(7047):117-122.

49. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006;12(9):406-414.
50. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(11):875-885.
51. Niault TS, Baccharini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2010;31(7):1165-1174.
52. Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1995;15(11):6430-6442.
53. Emuss V, Garnett M, Mason C, Marais R. Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res* 2005;65(21):9719-9726.
54. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* 2003;63(4):756-759.
55. Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21(1):27-38.
56. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2008;20(2):183-189.
57. Brose MS, Volpe P, Feldman M et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62(23):6997-7000.
58. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1239-1246.
59. Kirschner M, Helmke B, Starz H, Benner A, Thome M, Deichmann M. Preponderance of the oncogenic V599E and V599K mutations in the B-raf kinase domain is enhanced in melanoma lymph node metastases. *Melanoma Res* 2005;15(5):427-434.
60. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A et al. Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(5):991-997.
61. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010;8:67.
62. Martin-Algarra S, Fernandez-Figueras MT, Lopez-Martin JA et al. Guidelines for biomarker testing in metastatic melanoma: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 2014;16(4):362-373.
63. Curry JL, Torres-Cabala CA, Tetzlaff MT, Bowman C, Prieto VG. Molecular platforms utilized to detect BRAF V600E mutation in melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2012;31(4):267-273.

64. Drobetsky EA, Turcotte J, Chateauneuf A. A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(6):2350-2354.
65. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(22):10124-10128.
66. Ichii-Nakato N, Takata M, Takayanagi S et al. High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi. *J Invest Dermatol* 2006;126(9):2111-2118.
67. Papp T, Schipper H, Kumar K, Schiffmann D, Zimmermann R. Mutational analysis of the BRAF gene in human congenital and dysplastic melanocytic naevi. *Melanoma Res* 2005;15(5):401-407.
68. 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(8):610-614.
69. Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ et al. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2003;121(5):1160-1162.
70. Cohen Y, Rosenbaum E, Begum S et al. Exon 15 BRAF mutations are uncommon in melanomas arising in nonsun-exposed sites. *Clin Cancer Res* 2004;10(10):3444-3447.
71. Cohen Y, Xing M, Mambo E et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(8):625-627.
72. Singer G, Oldt R, III, Cohen Y et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(6):484-486.
73. Yuen ST, Davies H, Chan TL et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002;62(22):6451-6455.
74. Lee JW, Yoo NJ, Soung YH et al. BRAF mutations in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 2003;89(10):1958-1960.
75. Lee JW, Soung YH, Park WS et al. BRAF mutations in acute leukemias. *Leukemia* 2004;18(1):170-172.
76. Lee SH, Lee JW, Soung YH et al. BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene* 2003;22(44):6942-6945.
77. Sommerer F, Vieth M, Markwarth A et al. Mutations of BRAF and KRAS2 in the development of Barrett's adenocarcinoma. *Oncogene* 2004;23(2):554-558.
78. Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003;52(5):706-712.
79. Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002;62(23):7001-7003.

80. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63(7):1454-1457.
81. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5399-5404.
82. Zaal LH, Mooi WJ, Sillevius Smitt JH, van der Horst CM. Classification of congenital melanocytic naevi and malignant transformation: a review of the literature. *Br J Plast Surg* 2004;57(8):707-719.
83. Lang J, Boxer M, MacKie R. Absence of exon 15 BRAF germline mutations in familial melanoma. *Hum Mutat* 2003;21(3):327-330.
84. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T et al. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat* 2010;31(3):284-294.
85. Hernandez-Martin A, Torrelo A. Rasopathies: developmental disorders that predispose to cancer and skin manifestations. *Actas Dermosifiliogr* 2011;102(6):402-416.
86. Sarkozy A, Carta C, Moretti S et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 2009;30(4):695-702.
87. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE et al. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* 2006;311(5765):1287-1290.
88. Reynolds JF, Neri G, Herrmann JP et al. New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement--the CFC syndrome. *Am J Med Genet* 1986;25(3):413-427.
89. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 2006;38(3):294-296.
90. Siegel DH, McKenzie J, Frieden IJ, Rauen KA. Dermatological findings in 61 mutation-positive individuals with cardiofaciocutaneous syndrome. *Br J Dermatol* 2011;164(3):521-529.
91. Smit E. BRAF mutations in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014;9(11):1594-1595.
92. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011;364(24):2305-2315.
93. Laennec RTH. Sur les melanoses. *Bull Faculte Med Paris* 1812;1:23-26.
94. McGovern VJ, Mihm MC, Jr., Bailly C et al. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer* 1973;32(6):1446-1457.

95. McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, Little JH, MacLennan R. The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology* 1986;18(1):12-21.
96. The International Agency for Research on Cancer (IARC). *Pathology and Genetics of Skin Tumours*. Lyon: IARCpress; 2006.
97. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3635-3648.
98. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 2003;163(5):1765-1770.
99. Viros A, Fridlyand J, Bauer J et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 2008;5(6):e120.
100. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23(6):763-770.
101. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(24):1878-1890.
102. Sensi M, Nicolini G, Petti C et al. Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene* 2006;25(24):3357-3364.
103. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24(26):4340-4346.
104. Onken MD, Worley LA, Long MD et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(12):5230-5234.
105. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 2009;457(7229):599-602.
106. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(23):2191-2199.
107. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24(5):879-897.
108. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H et al. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 2000;60(7):1968-1973.
109. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994;8(1):15-21.
110. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994;8(1):23-26.

111. Puig S, Malvehy J, Badenas C et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol* 2005;23(13):3043-3051.
112. Goldstein AM, Chan M, Harland M et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 2007;44(2):99-106.
113. Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W et al. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2009;61(4):677-14.
114. Newton Bishop JA, Gruis NA. Genetics: what advice for patients who present with a family history of melanoma? *Semin Oncol* 2007;34(6):452-459.
115. Horn S, Figl A, Rachakonda PS et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 2013;339(6122):959-961.
116. Shi J, Yang XR, Ballew B et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet* 2014;46(5):482-486.
117. Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet* 2014;46(5):478-481.
118. Wiesner T, Obenaus AC, Murali R et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet* 2011;43(10):1018-1021.
119. Wiesner T, Fried I, Ulz P et al. Toward an improved definition of the tumor spectrum associated with BAP1 germline mutations. *J Clin Oncol* 2012;30(32):e337-e340.
120. Piris A, Mihm MC, Jr., Hoang MP. BAP1 and BRAFV600E expression in benign and malignant melanocytic proliferations. *Hum Pathol* 2015;46(2):239-245.
121. Palmedo G, Hantschke M, Rutten A et al. The T1796A mutation of the BRAF gene is absent in Spitz nevi. *J Cutan Pathol* 2004;31(3):266-270.
122. Murali R, Wilmott JS, Jakrot V et al. BAP1 expression in cutaneous melanoma: a pilot study. *Pathology* 2013;45(6):606-609.
123. Busam KJ, Sung J, Wiesner T, von DA, Jungbluth A. Combined BRAF(V600E)-positive melanocytic lesions with large epithelioid cells lacking BAP1 expression and conventional nevomelanocytes. *Am J Surg Pathol* 2013;37(2):193-199.
124. Yeh I, Mully TW, Wiesner T et al. Ambiguous melanocytic tumors with loss of 3p21. *Am J Surg Pathol* 2014;38(8):1088-1095.
125. Gammon B, Traczyk TN, Gerami P. Clumped perinuclear BAP1 expression is a frequent finding in sporadic epithelioid Spitz tumors. *J Cutan Pathol* 2013;40(6):538-542.
126. Miller DM, Flaherty KT, Tsao H. Commentary: Molecular testing in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2014;70(5):863-870.
127. Dacarbazine (DTIC) in malignant melanoma. *Drug Ther Bull* 1976;14(10):39-40.

128. Johnson RO, Metter G, Wilson W, Hill G, Kremenz E. Phase I evaluation of DTIC (NSC-45388) and other studies in malignant melanoma in the Central Oncology Group. *Cancer Treat Rep* 1976;60(2):183-187.
129. Luce JK, Thurman WG, Isaacs BL, Talley RW. Clinical trials with the antitumor agent 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide(NSC-45388). *Cancer Chemother Rep* 1970;54(2):119-124.
130. Wagner DE, Ramirez G, Weiss AJ, Hill G, Jr. Combination phase 1-II study of imidazole carboxamide (NCS45388). *Oncology* 1972;26(2):310-316.
131. Carter RD, Kremenz ET, Hill GJ et al. DTIC (nsc-45388) and combination therapy for melanoma. I. Studies with DTIC, BCNU (NSC-409962), CCNU (NSC-79037), vincristine (NSC-67574), and hydroxyurea (NSC-32065). *Cancer Treat Rep* 1976;60(5):601-609.
132. Hill GJ, Metter GE, Kremenz ET et al. DTIC and combination therapy for melanoma. II. Escalating schedules of DTIC with BCNU, CCNU, and vincristine. *Cancer Treat Rep* 1979;63(11-12):1989-1992.
133. Hill GJ, Moss SE, Golomb FM et al. DTIC and combination therapy for melanoma: III. DTIC (NSC 45388) Surgical Adjuvant Study COG PROTOCOL 7040. *Cancer* 1981;47(11):2556-2562.
134. Hill GJ, Kremenz ET, Hill HZ. Dimethyl triazeno imidazole carboxamide and combination therapy for melanoma. IV. Late results after complete response to chemotherapy (Central Oncology Group protocols 7130, 7131, and 7131A). *Cancer* 1984;53(6):1299-1305.
135. Comis RL. DTIC (NSC-45388) in malignant melanoma: a perspective. *Cancer Treat Rep* 1976;60(2):165-176.
136. Hersey P, Bastholt L, Chiarion-Sileni V et al. Small molecules and targeted therapies in distant metastatic disease. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 6:vi35-vi40.
137. Carter SK, Friedman MA. 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide (DTIC, DIC, NSC-45388)--a new antitumor agent with activity against malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1972;8(1):85-92.
138. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999;17(7):2105-2116.
139. Schwartzenuber DJ, Lawson DH, Richards JM et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 2011;364(22):2119-2127.
140. Gabriel EM, Lattime EC. Anti-CTL-associated antigen 4: are regulatory T cells a target? *Clin Cancer Res* 2007;13(3):785-788.
141. Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 2006;355(10):973-975.

142. O'Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V et al. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol* 2010;21(8):1712-1717.
143. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711-723.
144. Wolchok JD, Neyns B, Linette G et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010;11(2):155-164.
145. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011;364(26):2517-2526.
146. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455-2465.
147. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010;28(19):3167-3175.
148. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-2454.
149. Hamid O, Robert C, Daud A et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369(2):134-144.
150. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013;369(2):122-133.
151. Riley JL. Combination checkpoint blockade--taking melanoma immunotherapy to the next level. *N Engl J Med* 2013;369(2):187-189.
152. Cocconi G. High-dose cisplatin with dacarbazine and tamoxifen in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer* 1992;70(4):902.
153. Cocconi G, Bella M, Calabresi F et al. Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus tamoxifen. *N Engl J Med* 1992;327(8):516-523.
154. Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer* 2006;95(5):581-586.
155. McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R et al. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. *J Clin Oncol* 2008;26(13):2178-2185.
156. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 2009;27(17):2823-2830.

157. Wilhelm SM, Carter C, Tang L et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64(19):7099-7109.
158. Eggermont AM, Robert C. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur J Cancer* 2011;47(14):2150-2157.
159. Su Y, Vilgelm AE, Kelley MC et al. RAF265 inhibits the growth of advanced human melanoma tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18(8):2184-2198.
160. Flaherty KT, Robert C, Hersey P et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012;367(2):107-114.
161. Falchook GS, Lewis KD, Infante JR et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 2012;13(8):782-789.
162. Flaherty KT, Infante JR, Daud A et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012;367(18):1694-1703.
163. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 2011;305(22):2327-2334.
164. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 2013;31(26):3182-3190.
165. Minor DR, Kashani-Sabet M, Garrido M, O'Day SJ, Hamid O, Bastian BC. Sunitinib therapy for melanoma patients with KIT mutations. *Clin Cancer Res* 2012;18(5):1457-1463.
166. Carvajal RD, Lawrence DP, Weber JS et al. Phase II Study of Nilotinib in Melanoma Harboring KIT Alterations Following Progression to Prior KIT Inhibition. *Clin Cancer Res* 2015;21(10):2289-2296.
167. Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364(26):2507-2516.
168. Ribas A, Kim KB, Schuchter LM, et al. BRIM-2: an open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAFV600E mutation positive melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(Suppl):8509.
169. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012;366(8):707-714.
170. McArthur GA, Chapman PB, Robert C et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 2014;15(3):323-332.
171. van den Brom RR, de Vries EG, Schroder CP, Hospers GA. Effect of vemurafenib on a V600R melanoma brain metastasis. *Eur J Cancer* 2013;49(7):1795-1796.

172. Rochet NM, Kottschade LA, Markovic SN. Vemurafenib for melanoma metastases to the brain. *N Engl J Med* 2011;365(25):2439-2441.
173. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380(9839):358-365.
174. Long GV, Trefzer U, Davies MA et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(11):1087-1095.
175. Ponti G, Tomasi A, Pellacani G. Overwhelming response to Dabrafenib in a patient with double BRAF mutation (V600E; V600M) metastatic malignant melanoma. *J Hematol Oncol* 2012;5:60.
176. Trefzer U, Minor D, Ribas A et al. BREAK-2: a phase IIA trial of the selective BRAF kinase inhibitor GSK2118436 in patients with BRAF mutation-positive (V600E/K) metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24:1020.
177. Halaban R, Zhang W, Bacchicocchi A et al. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23(2):190-200.
178. Klein O, Clements A, Menzies AM, O'Toole S, Kefford RF, Long GV. BRAF inhibitor activity in V600R metastatic melanoma. *Eur J Cancer* 2013;49(5):1073-1079.
179. Klein O, Clements A, Menzies AM, O'Toole S, Kefford RF, Long GV. BRAF inhibitor activity in V600R metastatic melanoma--response. *Eur J Cancer* 2013;49(7):1797-1798.
180. Ascierto PA. MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012;367(14):1364.
181. Falchook GS, Long GV, Kurzrock R et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2012;379(9829):1893-1901.
182. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010;468(7326):968-972.
183. Nazarian R, Shi H, Wang Q et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468(7326):973-977.
184. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(48):20411-20416.
185. Wagle N, Emery C, Berger MF et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2011;29(22):3085-3096.
186. Wang H, Daouti S, Li WH et al. Identification of the MEK1(F129L) activating mutation as a potential mechanism of acquired resistance to MEK inhibition in human cancers carrying the B-RafV600E mutation. *Cancer Res* 2011;71(16):5535-5545.

187. Montagut C, Sharma SV, Shioda T et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 2008;68(12):4853-4861.
188. Kaplan FM, Shao Y, Mayberry MM, Aplin AE. Hyperactivation of MEK-ERK1/2 signaling and resistance to apoptosis induced by the oncogenic B-RAF inhibitor, PLX4720, in mutant N-RAS melanoma cells. *Oncogene* 2011;30(3):366-371.
189. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011;480(7377):387-390.
190. Straussman R, Morikawa T, Shee K et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012;487(7408):500-504.
191. Villanueva J, Vultur A, Lee JT et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 2010;18(6):683-695.
192. Sambade MJ, Peters EC, Thomas NE, Kaufmann WK, Kimple RJ, Shields JM. Melanoma cells show a heterogeneous range of sensitivity to ionizing radiation and are radiosensitized by inhibition of B-RAF with PLX-4032. *Radiother Oncol* 2011;98(3):394-399.
193. Macklis R. Finally, a substantial role for radiotherapy in melanoma. *Lancet Oncol* 2012;13(6):561-562.
194. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1225-1231.
195. Boni A, Cogdill AP, Dang P et al. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res* 2010;70(13):5213-5219.
196. Sapkota B, Hill CE, Pollack BP. Vemurafenib enhances MHC induction in BRAF homozygous melanoma cells. *Oncoimmunology* 2013;2(1):e22890.
197. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med* 2013;368(14):1365-1366.
198. Hu-Lieskovan S, Robert L, Homet MB, Ribas A. Combining Targeted Therapy With Immunotherapy in BRAF-Mutant Melanoma: Promise and Challenges. *J Clin Oncol* 2014.
199. Harding JJ, Pulitzer M, Chapman PB. Vemurafenib sensitivity skin reaction after ipilimumab. *N Engl J Med* 2012;366(9):866-868.
200. Jang S, Atkins MB. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *Lancet Oncol* 2013;14(2):e60-e69.
201. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A et al. Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". *J Dtsch Dermatol Ges* 2013;11 Suppl 6:1-126.

202. Ascierto PA, Simeone E, Sileni VC et al. Sequential treatment with ipilimumab and BRAF inhibitors in patients with metastatic melanoma: data from the Italian cohort of the ipilimumab expanded access program. *Cancer Invest* 2014;32(4):144-149.
203. Huang V, Hepper D, Anadkat M, Cornelius L. Cutaneous toxic effects associated with vemurafenib and inhibition of the BRAF pathway. *Arch Dermatol* 2012;148(5):628-633.
204. Anforth R, Fernandez-Penas P, Long GV. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol* 2013;14(1):e11-e18.
205. Anforth RM, Blumetti TC, Kefford RF et al. Cutaneous manifestations of dabrafenib (GSK2118436): a selective inhibitor of mutant BRAF in patients with metastatic melanoma. *Br J Dermatol* 2012;167(5):1153-1160.
206. Harvey NT, Millward M, Wood BA. Squamoproliferative lesions arising in the setting of BRAF inhibition. *Am J Dermatopathol* 2012;34(8):822-826.
207. Chu EY, Wanat KA, Miller CJ et al. Diverse cutaneous side effects associated with BRAF inhibitor therapy: a clinicopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 2012;67(6):1265-1272.
208. Shailesh FN, Singh M, Tiwari U, Hutchins LF. Vemurafenib-induced bilateral facial palsy. *J Postgrad Med* 2014;60(2):187-188.
209. Klein O, Ribas A, Chmielowski B et al. Facial palsy as a side effect of vemurafenib treatment in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31(12):e215-e217.
210. Gelot P, Dutartre H, Khammari A et al. Vemurafenib: an unusual UVA-induced photosensitivity. *Exp Dermatol* 2013;22(4):297-298.
211. Dummer R, Rinderknecht J, Goldinger SM. Ultraviolet A and photosensitivity during vemurafenib therapy. *N Engl J Med* 2012;366(5):480-481.
212. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* 2012;10:85.
213. Arnault JP, Wechsler J, Escudier B et al. Keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in patients receiving sorafenib. *J Clin Oncol* 2009;27(23):e59-e61.
214. Kwon EJ, Kish LS, Jaworsky C. The histologic spectrum of epithelial neoplasms induced by sorafenib. *J Am Acad Dermatol* 2009;61(3):522-527.
215. Kobayashi K, Pezen DS, Vogelzang NJ et al. Keratoacanthomas and skin neoplasms associated with suramin therapy. *Arch Dermatol* 1996;132(1):96-98.
216. Robert C, Arnault JP, Mateus C. RAF inhibition and induction of cutaneous squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2011;23(2):177-182.
217. Chapman PB, Hauschild A, McArthur G. Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;365(15):1448-1449.
218. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464(7287):431-435.

219. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464(7287):427-430.
220. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010;140(2):209-221.
221. Su F, Viros A, Milagre C et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012;366(3):207-215.
222. Lacouture ME, O'Reilly K, Rosen N, Solit DB. Induction of cutaneous squamous cell carcinomas by RAF inhibitors: cause for concern? *J Clin Oncol* 2012;30(3):329-330.
223. Alloo A, Garibyan L, LeBoeuf N et al. Photodynamic therapy for multiple eruptive keratoacanthomas associated with vemurafenib treatment for metastatic melanoma. *Arch Dermatol* 2012;148(3):363-366.
224. Wantz M, Spanoudi-Kitrimi I, Lasek A, Lebas D, Quinchon JF, Modiano P. Vemurafenib-induced toxic epidermal necrolysis. *Ann Dermatol Venereol* 2014;141(3):215-218.
225. Johnson DB, Wallender EK, Cohen DN et al. Severe cutaneous and neurologic toxicity in melanoma patients during vemurafenib administration following anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol Res* 2013;1(6):373-377.
226. Ludlow SP, Pasikhova Y. Cumulative dermatologic toxicity with ipilimumab and vemurafenib responsive to corticosteroids. *Melanoma Res* 2013;23(6):496-497.
227. Minor DR, Rodvien R, Kashani-Sabet M. Successful desensitization in a case of Stevens-Johnson syndrome due to vemurafenib. *Melanoma Res* 2012;22(5):410-411.
228. Dalle S, Poulalhon N, Debarbieux S, Thomas L. Second primary melanomas on treatment with vemurafenib. *Br J Dermatol* 2013;168(4):887-888.
229. Debarbieux S, Dalle S, Depaepe L, Poulalhon N, Balme B, Thomas L. Second primary melanomas treated with BRAF blockers: study by reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol* 2013;168(6):1230-1235.
230. Dalle S, Poulalhon N, Thomas L. Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;365(15):1448-1449.
231. Zimmer L, Hillen U, Livingstone E et al. Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition. *J Clin Oncol* 2012;30(19):2375-2383.
232. Fearfield L, Newton-Bishop JA, Sinha R, Edmonds K, Gore ME, Larkin J. Second primary melanomas on treatment with vemurafenib: reply from the authors. *Br J Dermatol* 2013;168(4):888-889.
233. Infante JR, Fecher LA, Falchook GS et al. Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 2012;13(8):773-781.

234. Schoppmann SF, Jesch B, Zacherl J et al. HER-2 status in primary oesophageal cancer, lymph nodes and distant metastases. *Br J Surg* 2011;98(10):1408-1413.
235. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C et al. Analysis of the concordance in the EGFR pathway status between primary tumors and related metastases of colorectal cancer patients: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12(2):124-131.
236. Molinari F, Martin V, Saletti P et al. Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant. *Br J Cancer* 2009;100(7):1087-1094.
237. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM et al. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4217-4219.
238. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):790-799.
239. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C et al. KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One* 2009;4(12):e8199.
240. Baas JM, Krens LL, Guchelaar HJ, Morreau H, Gelderblom H. Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *Oncologist* 2011;16(9):1239-1249.
241. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y et al. Heterogeneity of KRAS status may explain the subset of discordant KRAS status between primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2011;54(9):1170-1178.
242. Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2011;104(6):1020-1026.
243. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4830-4835.
244. Loupakis F, Pollina L, Stasi I et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(16):2622-2629.
245. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008;13(12):1270-1275.
246. Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT. Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol* 2003;56(3):137-140.

247. Losi L, Benhattar J, Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A(6-7):1115-1120.
248. Pagni F, Zannella S, Ronchi S, Garanzini C, Leone BE. HER2 status of gastric carcinoma and corresponding lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res* 2013;19(1):103-109.
249. Kim MJ, Lee HS, Kim JH et al. Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012;12:347.
250. Colombino M, Capone M, Lissia A et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 2012;30(20):2522-2529.
251. 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(5):1753-1757.
252. Lin J, Goto Y, Murata H et al. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Br J Cancer* 2011;104(3):464-468.
253. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One* 2012;7(1):e29336.
254. Colomba E, Helias-Rodzewicz Z, von DA et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2013;15(1):94-100.
255. Ronaghi M, Nygren M, Lundeberg J, Nyren P. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Anal Biochem* 1999;267(1):65-71.
256. Sivertsson A, Platz A, Hansson J, Lundeberg J. Pyrosequencing as an alternative to single-strand conformation polymorphism analysis for detection of N-ras mutations in human melanoma metastases. *Clin Chem* 2002;48(12):2164-2170.
257. Cheng S, Koch WH, Wu L. Co-development of a companion diagnostic for targeted cancer therapy. *N Biotechnol* 2012;29(6):682-688.
258. Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU et al. Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136(11):1385-1391.
259. Martin-Algarra S, Labiano T, Echeveste JI et al. Use of Cobas 4800 BRAF mutation test for the analysis of BRAF V600 mutations in cytological samples (CS) from metastatic melanoma (MM). *J Clin Oncol* 2012;ASCO Annual Meeting Abstracts.Vol 30, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2012: 8572.
260. Capper D, Berghoff AS, Magerle M et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol* 2012;123(2):223-233.

261. Capper D, Preusser M, Habel A et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 2011;122(1):11-19.
262. Koperek O, Kornauth C, Capper D et al. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E-mutated protein in papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2012;36(6):844-850.
263. Mitteldorf C, Bertsch HP, Zapf A, Neumann C, Kretschmer L. Cutting a sentinel lymph node into slices is the optimal first step for examination of sentinel lymph nodes in melanoma patients. *Mod Pathol* 2009;22(12):1622-1627.
264. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172(5):902-908.
265. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29(3):705-727.
266. Spatz A, Cook MG, Elder DE, Piepkorn M, Ruitter DJ, Barnhill RL. Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas. *Eur J Cancer* 2003;39(13):1861-1865.
267. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med* 2009;7:86.
268. Chang DZ, Panageas KS, Osman I, Polsky D, Busam K, Chapman PB. Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma. *J Transl Med* 2004;2(1):46.
269. Gorden A, Osman I, Gai W et al. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res* 2003;63(14):3955-3957.
270. Moreau S, Saiag P, Aegerter P et al. Prognostic value of BRAFV600 mutations in melanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2012;19(13):4314-4321.
271. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(12):3242-3249.
272. Lancaster HO. Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. *Med J Aust* 1956;43(26):1082-1087.
273. Magnus K. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1970. Variations in time and space and solar radiation. *Cancer* 1973;32(5):1275-1286.
274. Teppo L, Pakkanen M, Hakulinen T. Sunlight as a risk factor of malignant melanoma of the skin. *Cancer* 1978;41(5):2018-2027.
275. Crombie IK. Variation of melanoma incidence with latitude in North America and Europe. *Br J Cancer* 1979;40(5):774-781.

276. Swerdlow AJ. Incidence of malignant melanoma of the skin in England and Wales and its relationship to sunshine. *Br Med J* 1979;2(6201):1324-1327.
277. Bulliard JL, Cox B, Elwood JM. Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand. *Cancer Causes Control* 1994;5(3):234-240.
278. Van der Lubbe JL, Rosdorff HJ, Bos JL, Van der Eb AJ. Activation of N-ras induced by ultraviolet irradiation in vitro. *Oncogene Res* 1988;3(1):9-20.
279. Tormanen VT, Pfeifer GP. Mapping of UV photoproducts within ras proto-oncogenes in UV-irradiated cells: correlation with mutations in human skin cancer. *Oncogene* 1992;7(9):1729-1736.
280. Edwards RH, Ward MR, Wu H et al. Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet* 2004;41(4):270-272.
281. Scherer D, Rachakonda PS, Angelini S et al. Association between the germline MC1R variants and somatic BRAF/NRAS mutations in melanoma tumors. *J Invest Dermatol* 2010;130(12):2844-2848.
282. Hacker E, Nagore E, Cerroni L et al. NRAS and BRAF mutations in cutaneous melanoma and the association with MC1R genotype: findings from Spanish and Austrian populations. *J Invest Dermatol* 2013;133(4):1027-1033.
283. Bauer J, Buttner P, Murali R et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24(2):345-351.
284. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2015;72(6):1036-1046.
285. Liu W, Kelly JW, Trivett M et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2007;127(4):900-905.
286. Deichmann M, Krahl D, Thome M, Wust K, Hassanzadeh J, Helmke B. The oncogenic B-raf V599E mutation occurs more frequently in melanomas at sun-protected body sites. *Int J Oncol* 2006;29(1):139-145.
287. Davison JM, Rosenbaum E, Barrett TL et al. Absence of V599E BRAF mutations in desmoplastic melanomas. *Cancer* 2005;103(4):788-792.
288. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(2):229-235.
289. Lee HW, Song KH, Hong JW et al. Frequency of BRAF Mutation and Clinical Relevance for Primary Melanomas. *Korean J Pathol* 2012;46(3):246-252.
290. Schlaak M, Bajah A, Podewski T et al. Assessment of clinical parameters associated with mutational status in metastatic malignant melanoma: a single-centre investigation of 141 patients. *Br J Dermatol* 2013;168(4):708-716.

291. Thomas NE, Kanetsky PA, Begg CB, Conway K, Berwick M. Melanoma molecular subtypes: unifying and paradoxical results. *J Invest Dermatol* 2010;130(1):12-14.
292. Elwood JM, Gallagher RP. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer* 1998;78(3):276-280.
293. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the surveillance, epidemiology, and end results program. *J Invest Dermatol* 2008;128(5):1340-1342.
294. Bulliard JL. Site-specific risk of cutaneous malignant melanoma and pattern of sun exposure in New Zealand. *Int J Cancer* 2000;85(5):627-632.
295. Bulliard JL, Cox B, Elwood JM. Comparison of the site distribution of melanoma in New Zealand and Canada. *Int J Cancer* 1997;72(2):231-235.
296. Green A, MacLennan R, Youl P, Martin N. Site distribution of cutaneous melanoma in Queensland. *Int J Cancer* 1993;53(2):232-236.
297. Kruger S, Garbe C, Buttner P, Stadler R, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma. Results of a case control study in melanoma patients and nonmelanoma control subjects. *J Am Acad Dermatol* 1992;26(6):920-926.
298. Chen YT, Dubrow R, Holford TR et al. Malignant melanoma risk factors by anatomic site: a case-control study and polychotomous logistic regression analysis. *Int J Cancer* 1996;67(5):636-643.
299. Rieger E, Soyer HP, Garbe C et al. Overall and site-specific risk of malignant melanoma associated with nevus counts at different body sites: a multicenter case-control study of the German Central Malignant-Melanoma Registry. *Int J Cancer* 1995;62(4):393-397.
300. Weinstock MA, Colditz GA, Willett WC et al. Moles and site-specific risk of nonfamilial cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst* 1989;81(12):948-952.
301. Saroufim M, Novy M, Taraif S et al. BRAF mutational epidemiology in dysplastic nevi: does different solar UV radiation exposure matter? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28(5):615-625.
302. Celebi JT, Ward KM, Wanner M, Polsky D, Kopf AW. Evaluation of germline CDKN2A, ARF, CDK4, PTEN, and BRAF alterations in atypical mole syndrome. *Clin Exp Dermatol* 2005;30(1):68-70.
303. Si L, Kong Y, Xu X et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur J Cancer* 2012;48(1):94-100.
304. Fuente: <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-survival-rates>. 2015

305. Akslen LA, Angelini S, Straume O et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol* 2005;125(2):312-317.
306. Devitt B, Liu W, Salemi R et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24(4):666-672.
307. Jakob JA, Bassett RL, Jr., Ng CS et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012;118(16):4014-4023.
308. Nagore E, Requena C, Traves V et al. Prognostic value of BRAF mutations in localized cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2014;70(5):858-862.
309. Kumar R, Angelini S, Czene K et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003;9(9):3362-3368.
310. Houben R, Becker JC, Kappel A et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog* 2004;3(1):6.
311. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol* 2010;28(14):2452-2459.
312. Sasaki Y, Niu C, Makino R et al. BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype. *J Invest Dermatol* 2004;123(1):177-183.
313. Saldanha G, Potter L, Daferno P, Pringle JH. Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. *Clin Cancer Res* 2006;12(15):4499-4505.
314. Bonnelykke-Behrndtz LM, Schmidt H, Damsgaard TE et al. Consumption of the Epidermis: A Suggested Precursor of Ulceration Associated With Increased Proliferation of Melanoma Cells. *Am J Dermatopathol* 2015;37(11):841-845.
315. Walters RF, Groben PA, Busam K et al. Consumption of the epidermis: a criterion in the differential diagnosis of melanoma and dysplastic nevi that is associated with increasing breslow depth and ulceration. *Am J Dermatopathol* 2007;29(6):527-533.
316. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Swetter SM, Detmar M, Dadras SS. Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. *J Cutan Pathol* 2009;36(7):772-780.
317. Bucheit AD, Syklawer E, Jakob JA et al. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2013;119(21):3821-3829.
318. Omholt K, Karsberg S, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2002;8(11):3468-3474.

319. Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015;28(4):390-406.
320. Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol* 2005;170(5):703-708.
321. Liegl B, Kepten I, Le C et al. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* 2008;216(1):64-74.
322. Busam KJ, Hedvat C, Pulitzer M, von DA, Jungbluth AA. Immunohistochemical analysis of BRAF(V600E) expression of primary and metastatic melanoma and comparison with mutation status and melanocyte differentiation antigens of metastatic lesions. *Am J Surg Pathol* 2013;37(3):413-420.
323. Sigalotti L, Fratta E, Parisi G, Coral S, Maio M. Stability of BRAF V600E mutation in metastatic melanoma: new insights for therapeutic success? *Br J Cancer* 2011;105(2):327-328.
324. Niessner H, Forschner A, Klumpp B et al. Targeting hyperactivation of the AKT survival pathway to overcome therapy resistance of melanoma brain metastases. *Cancer Med* 2013;2(1):76-85.

ANEXOS

I. Cobas® DNA Sample Preparation Kit



Propietario Autorización Comercialización

Roche Farma, S.A.

Eucalipto, 33
E-28016 Madrid
España

Roche Diagnostics, S.L.

Av. de la Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès (Barcelona)
España

II. Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test



Propietario Autorización Comercialización

Roche Farma, S.A.

Eucalipto, 33
E-28016 Madrid
España

Roche Diagnostics, S.L.

Av. de la Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès (Barcelona)
España

