

Factor pronóstico del estado mutacional de BRAF
en pacientes afectos de melanoma metastásico

Neda Stjepanovic

Trabajo de investigación- Suficiencia investigadora

FACTOR PRONÓSTICO DEL ESTADO MUTACIONAL DE BRAF EN PACIENTES AFECTOS DE MELANOMA METASTÁSICO

AUTORA: Neda Stjepanovic

DIRECTOR: Javier Cortés Castán

Departamento de Oncología Médica Hospital Vall d'Hebrón.

CO-DIRECTOR: Josep M^a Suriñach Caralt

Departamento de Medicina Interna Hospital Vall d'Hebron, Universidad
Autónoma de Barcelona.

Curso 2011-2012, Convocatoria de Septiembre.

ÍNDICE:

Índice	1
Resumen	2
Introducción	3
Material y métodos	14
Resultados	18
Discusión	27
Conclusiones	34
Bibliografía	35

RESUMEN:

Las mutaciones genéticas que llevan a la alteración del ciclo celular se han relacionado con el desarrollo de múltiples neoplasias. Se ha descrito que hasta el 55% de los melanomas presentan una aberración del gen BRAF que induce la sobreactivación de la vía MAPK, estimulando así el crecimiento de las células melanocíticas.

Por ello, se ha diseñado este estudio retrospectivo con pacientes diagnosticados de melanoma metastásico, en los que se ha analizado el estado mutacional de BRAF con el objetivo de determinar su frecuencia y su repercusión clínica.

De los 25 pacientes incluidos, 13 (52%) presentan mutación del gen BRAF y 12 (48%) no la presentan. Los pacientes portadores de la mutación de BRAF, son diagnosticados del tumor primario a una edad más joven (51 años) y con estadios más tempranos. La supervivencia global desde el diagnóstico de las metástasis no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, con una mediana para el grupo BRAF mutado vs. grupo no mutado de 10,8 vs. 32,2 meses, respectivamente, Hazard ratio (HR) de 1,04 (IC 95% 0,37–2,87), $p=0,944$. Las medianas de supervivencia global desde el diagnóstico del tumor primario son de 84,7 vs. 67,5 meses, para el grupo BRAF mutado vs. no mutado, siendo esta diferencia no estadísticamente significativa.

Globalmente, podemos concluir que el estatus de portador de mutación de BRAF no confiere una mayor supervivencia global en aquellos pacientes afectados de melanoma metastásico. No obstante, estos datos habría que analizarlos con cautela debido al escaso tamaño muestral de este estudio.

INTRODUCCIÓN:

El melanoma maligno representa el 2,5% de todos los tumores y un 1-2% de las muertes causadas por cáncer. Es la segunda forma más frecuente de cáncer en hombres y mujeres en edades inferiores a 40 años [1] y su incidencia ha presentado un incremento de un 3%-6% [2,3] anual en los últimos 25 años. La tasa más alta registrada mundialmente se encuentra en Australia y Nueva Zelanda, con una tasa de incidencia de entre 23-55 casos por 100.000 habitantes y año, seguido de América del Norte con una tasa de incidencia de entre 14-19 casos por cada 100.000 habitantes y año. A nivel europeo la tasa de incidencia se sitúa entre 3-5 casos/100.000 habitantes y año en los países Mediterráneos [4] y 12-20 casos/100.000 habitantes y año en los países Nórdicos [5,6]. En España, la incidencia del melanoma maligno es de 6,7 casos/100.000 habitantes y año, según los datos disponibles en el European Cancer Observatory correspondientes al año 2008. A diferencia de América del Norte donde la incidencia es más alta en la población masculina, en los países europeos existe una mayor incidencia en la población femenina [6].

Dentro de los tumores cutáneos, el melanoma maligno es menos frecuente que el carcinoma espinocelular y el basocelular, pero tiene un peor pronóstico representando 6 de cada 7 muertes por cáncer de piel [4, 5]. La mortalidad por melanoma también ha presentado un aumento progresivo en los últimos años, con un incremento anual del 2% desde los años 60 [7]. A pesar de la alta tasa de curación que presentan los melanomas primarios localizados, los cuales presentan una supervivencia del 98,3% a los 5 años del diagnóstico, los pacientes afectos de melanoma metastásico presentan una supervivencia inferior al 10% a los 5 años del diagnóstico [2]. Según un análisis realizado por el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) la supervivencia media de un paciente afecto de melanoma metastásico es de aproximadamente seis meses, siendo ésta condicionada por el número de órganos afectos así como de la localización de las diferentes metástasis [8].

El melanoma maligno tiene su origen en las células melanocíticas que derivan de la cresta neural. La mayoría de estos tumores son en un 91,2% de los casos de origen cutáneo, en un 5,3% de origen ocular, en un 1,3% de origen en mucosas y finalmente, en 2,2% de los casos presentan un origen desconocido [2]. La etiología de la enfermedad es compleja y muy heterogénea, teniendo en la mayoría de los casos un origen esporádico. Dicha forma esporádica representa más del 90% de los casos y está relacionada de manera directa con la exposición solar y las quemaduras secundarias, sobre todo durante la infancia [9]. También se conocen otros factores de riesgo como es la presencia de nevus atípicos, antecedente previo de melanoma, un estado de inmunosupresión, el tratamiento con psoralenos, la exposición a la luz ultravioleta A (UVA), el estatus socioeconómico alto y los antecedentes de melanoma maligno en un familiar de primer nivel [10,11].

Existe una entidad conocida como melanoma hereditario, el cual representa <1% de todos los melanomas. Está asociado a la presencia de alelos de alta penetrancia y de alto riesgo y se caracteriza por un patrón unilateral de transmisión del melanoma, de inicio temprano y con la presencia de tumores primarios múltiples. También se ha relacionado con la mutación de 2 genes: CDKN2A y CDK4, y posiblemente existe otro gen en el cromosoma 1p22 que podría tener relación con el desarrollo de la enfermedad. La mayoría de las mutaciones del gen CDKN2A se dan en los exones 1α y 2, y la frecuencia de dicha mutación varía entre el 0,01% de la población normal y hasta un 40% en algunas familias. El riesgo de desarrollar un melanoma familiar es variable según el grado de penetrancia de los 3 genes de susceptibilidad que son CMM1, CMM2 y CDK4, oscilando dicho riesgo entre el 38 y el 75 %. Los melanomas familiares pueden ser divididos en tres grupos: los melanomas esporádicos que se observan en familiares, los melanomas que se observan en relación con genes (alelos) de bajo riesgo, y finalmente los melanomas que se observan en genes (alelos) de alto riesgo y con penetrancia alta; este último grupo es el que se considera melanoma hereditario.

El fármaco que se ha mostrado más beneficioso como tratamiento adyuvante del melanoma maligno es el interferón alfa (IFN). El esquema más utilizado para el tratamiento de los melanomas de alto riesgo es el de IFN a dosis altas, basándose en los datos de tres estudios [12-14]. El estudio ECOG 168437 [12] que comparaba el tratamiento adyuvante con IFN a dosis altas con observación, reportó un beneficio tanto en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) como en la supervivencia global (SG) para el grupo de pacientes tratados con IFN con un incremento estadísticamente significativo de la SLE media de 1 año a 1,7 años y un incremento de la SG de 2,8 años a 3,8 años sin alcanzarse la significación estadística. El mismo grupo de investigadores realizó posteriormente el estudio ECOG 169038 [13] que comparaba observación con tratamiento adyuvante con el régimen de dosis altas de IFN y el régimen de dosis bajas de IFN. Este estudio no mostró beneficios en términos de supervivencia global en ninguno de los dos grupos de IFN comparado con el grupo de observación. La mejoría de la SLE fue estadísticamente significativa en los pacientes tratados en el régimen de IFN a dosis altas comparado con el grupo de observación (a los 5 años una SLE de 44% vs. 35% respectivamente), sin embargo no hubo ventaja significativa en SLE para el grupo de IFN a dosis bajas comparado con observación (a los 5 años SLE de 40% vs 35% respectivamente). En un estudio más reciente, el ECOG 169439 [14] que comparaba tratamiento adyuvante con la vacuna GMK con IFN a dosis altas se cerró precozmente tras demostrarse la inferioridad del primer tratamiento. En este estudio los pacientes tratados con IFN tuvieron una SLE significativamente mejor con una HR de 1,47 y una SG significativamente mayor con una HR de 1,52 comparado con el grupo de pacientes tratados con GMK. Los datos de dichos estudios sugieren un beneficio estadísticamente significativo de IFN a dosis altas en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad tanto comparado con el régimen de observación como con las vacunas GMK, aunque no se ha podido establecer su utilidad en términos de la supervivencia global.

Como ya se ha comentado previamente, el melanoma maligno metastásico presenta altas tasas de mortalidad, así como resistencia a la mayoría de los tratamientos sistémicos. El tratamiento quimioterápico tiene mayoritariamente una misión paliativa como control de síntomas, así como control de la enfermedad. El tratamiento en primera línea más utilizado en el contexto metastásico se basa en la administración endovenosa de Dacarbazina (DTIC). Inicialmente este esquema reportó unas tasas de respuesta entorno a un 20%, una tasa de remisiones completas del 4-6% y una mediana de supervivencia de 8 a 10 meses [15]. Posteriormente en los estudios fase III realizados, la DTIC se asoció a tasas de respuesta del 7 al 12 % con una supervivencia global de entre 5,6 a 7,8 meses [16-19]. Sin embargo, éste fármaco nunca ha sido comparado con placebo y no se han reportado datos claros en cuanto a beneficio de supervivencia.

Otros agentes quimioterápicos utilizados en el contexto metastásico comprenden la Temozolamida (TMZ) y la Fotemustina (FM). La Temozolamida es un análogo de la DTIC, con una eficacia similar a la DTIC pero con algunas ventajas sobre ésta [17, 20, 21]: se puede administrar por vía oral con una buena biodisponibilidad, es mejor tolerado y atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que podría ser eficaz a nivel de afectación tumoral cerebral. En un estudio con 151 pacientes afectos de melanoma estadio IV al diagnóstico, se objetivó una tasa de respuesta a nivel del sistema nervioso central (SNC) del 7% y un 29% de los pacientes presentaron estabilizaciones a dicho nivel [22, 23]. En otro estudio fase III con 305 pacientes, la TMZ oral se mostró igual de eficaz que la DTIC endovenosa, con unas tasas de respuesta del 12,1% y 13,5% respectivamente. Los datos de supervivencia también resultaron ser similares entre ambos grupos con una mediana de supervivencia de 7,7 meses y 6,4 meses respectivamente, aunque sin llegar a alcanzar la significación estadística. Así mismo se observó una mejoría significativa en cuanto a supervivencia libre de progresión (1,9 meses vs. 1,5 meses, respectivamente), así como una mejor calidad de vida en el grupo tratado con temozolamida oral [17]. La Fotemustina también tiene un papel en el

tratamiento de los pacientes afectos de melanoma cutáneo estadio IV. En un estudio con 229 pacientes afectos de melanoma maligno estadio IV que incluía pacientes afectos de metástasis cerebrales, se comparó la eficacia de Fotesmustina vs. Dacarbazina. La tasa de respuestas fue superior en el grupo tratado con FM (15,2 % vs. 6,8 %, respectivamente), aunque la duración de dichas respuestas fue similar en ambos grupos de tratamiento (5,8 meses vs. 6,9 meses, respectivamente). La supervivencia global fue de 7,3 meses vs. 5,6 meses, respectivamente, y se objetivó que la FM prolongaba significativamente el tiempo hasta la aparición de metástasis cerebrales dada su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (22,7 meses vs. 7,2 meses, respectivamente) [18].

Los nuevos conocimientos de la inmunología y la patogénesis del melanoma han permitido identificar nuevas dianas terapéuticas, marcando un punto de inflexión en el desarrollo farmacológico de la inmunoterapia y de terapias dirigidas contra proteínas quinasas oncogénicas implicadas en las vías de señalización de la proliferación de las células tumorales. El primero de estos nuevos medicamentos inmunomoduladores es el Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal recombinante humano que bloquea el antígeno 4 asociado al linfocito T-citotóxico (CTLA-4), promoviendo de esta forma la inmunidad antitumoral de las células T. Es el primer fármaco que ha mostrado un beneficio significativo en la supervivencia global en los pacientes afectos de melanoma metastásico y ha sido aprobado para esa indicación por las administraciones competentes estadounidense (FDA), europea (EMA) y española (AEMPS). La eficacia y la seguridad de este nuevo fármaco han sido demostradas en un ensayo clínico fase III [24] con 676 pacientes afectos de melanoma estadio IV que habían progresado a al menos una línea de tratamiento para enfermedad metastásica. En este ensayo se comparó Ipilimumab con la vacuna gp100, objetivándose un aumento significativo de la supervivencia global al administrar Ipilimumab (10 meses vs. 6 meses, respectivamente). También fue demostrado el beneficio de Ipilimumab como tratamiento de primera línea en el melanoma metastásico en un estudio fase III [25] con 502 pacientes. En este estudio la

supervivencia global con la combinación de Ipilimumab-DTIC comparado con DTIC en monoterapia fue de 11,2 y 9,1 meses respectivamente.

Dentro de los últimos avances en el tratamiento del melanoma maligno, se encuentra un inhibidor específico de la forma mutada de la proteína BRAF V600, Vemurafenib, el cual ha sido aprobado por ambas agencias reguladoras (FDA y EMA) en base a los resultados obtenidos en dos ensayos clínicos fase II y III. El estudio fase II con 132 pacientes afectos de melanoma metastásico, portadores de la mutación BRAF V600E y en progresión a una primera línea de tratamiento estándar para melanoma metastásico o irresecable, objetivó una tasa de respuestas del 53%, con una media de duración de respuesta de 6,7 meses [26]. El estudio fase III con 675 pacientes afectos de melanoma metastásico o irresecable, comparó Vemurafenib con Dacarbacina como tratamiento de primera línea. Los pacientes tratados con Vemurafenib presentaron una tasa de respuestas del 48,1% comparado con 5,5% para el grupo que recibió tratamiento con DTIC ($p < 0,0001$). También se objetivó que Vemurafenib incrementaba la supervivencia libre de progresión con una diferencia significativa entre el grupo de Vemurafenib vs. DTIC de 5,3 meses vs. 1,6 meses respectivamente (HR de 0,26) [27].

Las mutaciones en el gen BRAF, el cual se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7, son las más frecuentemente halladas en pacientes afectos de melanoma cutáneo. Su frecuencia es de entre un 33% y 47% en los pacientes afectos de melanomas primarios [28-32] y de entre un 41% hasta un 55% en los pacientes afectos de melanomas metastásicos [33-36]. A nivel molecular, la presencia de una mutación a nivel del gen BRAF, lleva a la sobreactivación de la vía MAPK (mitogen-activated protein kinase) que a su vez estimula el crecimiento de las células melanocíticas. La activación de la vía MAPK también tiene lugar como consecuencia de las mutaciones somáticas de otros oncogenes, como N-RAS; sin embargo, las mutaciones de

N-RAS, a diferencia de las de BRAF, se han descrito únicamente en un 20 % de los melanomas cutáneos [37, 38].

El gen BRAF codifica para una serin/treonin kinasa que activa la cascada RAS/RAF/MEK/ERK implicada en la transducción de señales mitogénicas desde los receptores de membrana hasta el núcleo. En los melanocitos, la mutación de BRAF y por tanto el aumento de actividad de la vía MAPK lleva a la ausencia de apoptosis e induce el avance en el ciclo celular [39,40]. Se han descrito numerosas mutaciones de BRAF, preferentemente localizadas en el dominio tirosin kinasa del gen; la mutación más prevalente es la que tiene lugar por la sustitución T1799A en el exón 15, la cual lleva a un cambio del codón GTG (valina) por GAG (ácido glutámico) en la posición 600 (V600E). Estas mutaciones no se han encontrado en las células sanas de individuos afectos de melanoma, por lo que conceptualmente se considera que son adquiridas somáticamente. Dado que las mutaciones de BRAF también son comunes en los nevus melanocíticos, existe cierta controversia acerca del momento en que se adquiere dicha mutación. Algunos autores sugieren que la mutación de BRAF tiene un lugar temprano en la transformación melanocítica, ya que se han encontrado las mismas alteraciones tanto en el tumor primario como en el tejido metastásico [41,42]. Otros autores, sin embargo, han observado ausencia de mutación en el tumor primario y su presencia en el tejido metastásico [43], así como la presencia de mutación en melanomas en estadios avanzados, pero no en las fases tempranas de crecimiento radial del melanoma [44]. Las últimas observaciones nos llevarían a la hipótesis de que las mutaciones de BRAF en el melanoma maligno son adquiridas durante el desarrollo de la enfermedad, sobre todo en las fases de enfermedad avanzada.

Las características clínico-patológicas de los pacientes afectos de melanoma maligno portadores de la mutación en el oncogen BRAF comparado con los BRAF no mutados han sido analizadas en múltiples estudios [29, 33-35, 43, 45]. Su finalidad era determinar que pacientes serán, con más probabilidad,

portadores de la mutación de BRAF, así como la implicación del estado mutacional de BRAF en la evolución de la enfermedad, para evaluar si se trata de un factor pronóstico. Para ello, dichos estudios se centraron en el análisis de parámetros clínicos de los pacientes al diagnóstico del melanoma maligno, así como parámetros evolutivos como el intervalo libre de enfermedad desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la aparición de la enfermedad metastásica, la supervivencia global desde el diagnóstico de la enfermedad primaria y la supervivencia global desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica.

La edad más joven al diagnóstico del tumor primario independientemente del estadio, es una de las características clínicas a destacar de los pacientes afectados de melanoma maligno portadores de la mutación en el gen BRAF si se comparan con los BRAF no mutados. Incluso se ha propuesto que la edad menor de 55 años era un factor predictivo para estado BRAF mutado [31]. Diferentes grupos de investigación han confirmado esta diferencia en la edad media al diagnóstico, entre los pacientes afectados de melanoma BRAF mutado y BRAF no mutado: en un estudio realizado por Hacker *et ál.* [46] se reportaron unas edades medias de 47.6 años y 60.8 años respectivamente, en un estudio realizado por Liu *et ál.* [30] se reportaron unas edades inferiores a 50 y superiores a 50 años respectivamente, en el estudio llevado a cabo por Thomas *et ál.* [47], se objetivaron unas edades medias de 47.3 años y 53.9 años respectivamente y finalmente, el estudio realizado por el grupo de Long *et ál* [45] se objetivaron unas edades medias de 56 años y 63 años respectivamente.

Otra característica clínico-patológica de los melanomas con mutación del gen BRAF es que no parecen estar relacionados con el daño cutáneo crónico, normalmente por exposición solar. Por tanto es poco frecuente encontrar melanomas con mutación de BRAF en zonas con alta exposición solar como

son las zonas acrales o las de cabeza y el cuello, tal como se refiere en diferentes estudios [30, 46, 47].

Para determinar si el estado mutacional del oncogen BRAF es factor pronóstico en cuanto a tiempo hasta la recidiva y metastatización del melanoma maligno, se ha analizado en diversas publicaciones la supervivencia libre de enfermedad desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la aparición de recidiva o metástasis, comparando los pacientes portadores de la mutación del BRAF con los BRAF no mutados. Los resultados obtenidos en la literatura son dispares. En un estudio retrospectivo realizado por el grupo de Kumar *et ál.* [34] se incluyeron 38 pacientes afectos de melanoma maligno en estadio III y IV tratados en primera línea con diferentes regímenes de quimio-inmunoterapia (Dacarbazina, Vincristina, Bleomicina, Lomustina e Interferon). Este estudio reportó una SLE más larga en aquellos pacientes con el gen BRAF mutado comparado con los pacientes con el gen BRAF no mutado (12 vs. 5 meses, respectivamente), aunque sin llegar a obtener una significación estadística ($p=0,13$) [30]. Sin embargo otros dos estudios no reportaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor primario hasta la fase metastásica. Shinozaki *et ál.* [43], en su estudio de 59 pacientes con melanoma primario y 68 pacientes con melanoma metastásico, sugerían que BRAF no es un factor predictivo ya que no objetivaron una correlación significativa entre la presencia de la mutación de BRAF en el tumor primario y la supervivencia libre de enfermedad. En la misma línea de investigación, el grupo de Long *et ál.* [45] tampoco observó diferencias estadísticamente significativas en el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor primario hasta la fase metastásica en ambos grupos ($P 0,822$) y este resultado no varió en el análisis por subgrupos por edad.

A diferencia de la supervivencia libre de enfermedad, para la cual el estadio mutacional de BRAF parece dudoso, la supervivencia global desde el diagnóstico de la enfermedad diseminada en múltiples estudios ha sido

reportada como detrimental para el grupo de pacientes portadores de la mutación de BRAF comparado con el grupo con de pacientes BRAF no mutado. Houben *et ál.* [29] en su estudio con 174 pacientes diagnosticados de melanoma cutáneo, de entre los cuales 86 eran metastásicos, concluía que la presencia de la mutación BRAF en la enfermedad avanzada se asociaba a un peor pronóstico con una supervivencia significativamente más corta comparado con los BRAF no mutados ($p=0,02$). Otro estudio publicado por Urugel *et ál.* [35] llegó a la misma conclusión tras analizar el estado mutacional del gen BRAF en muestras de tejido y líneas celulares de 109 pacientes afectos de melanoma metastásico. Este estudio reportó una tendencia a peor supervivencia global tras el debut de enfermedad metastásica en los pacientes portadores de la mutación de BRAF, al analizar tanto las muestras de tejido ($P 0,052$) como las líneas celulares ($P 0,072$). El estudio prospectivo que apoya la teoría de que la mutación de BRAF es un factor de mal pronóstico en la enfermedad metastásica es el realizado por Long *et ál.* [45] con 197 pacientes con enfermedad avanzada. Este grupo de investigadores objetivó que los pacientes con mutación del gen BRAF y nunca tratados con inhibidores de BRAF comparado con el grupo de pacientes con BRAF no mutado, determinado en una población consecutiva de pacientes afectos de melanoma, presentan una peor supervivencia global tras el diagnóstico de la enfermedad metastásica y con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (11,1 meses y 46,1 meses, respectivamente con una $p 0,006$). Este grupo de investigadores, realizó el mismo análisis en el subgrupo de pacientes que fueron diagnosticados de melanoma metastásico únicamente durante el periodo de estudio, mostrando éstos una diferencia numérica en la supervivencia global tras el diagnóstico de enfermedad avanzada, siendo esta más corta en los portadores de la mutación de BRAF, aunque esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (5,7 meses vs. 8,5 meses $p 0,147$). Sin embargo, existe un estudio con menor número de pacientes realizado por Chang *et ál.* [33] que no confirma esta tendencia. Este estudio incluyó 68 pacientes con melanoma maligno estadios III y IV y no objetivó diferencias en la supervivencia según la presencia o la ausencia de la mutación de BRAF. Dado que se trata de estudios mayoritariamente retrospectivos con solo un

estudio prospectivo (el de Long *et ál.*), cuyos resultados en la mayoría de los casos no son estadísticamente significativos es difícil afirmar que la mutación de BRAF en el melanoma metastásico es factor pronóstico, aunque es cierto que existe una tendencia hacia ello.

La supervivencia global desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la muerte por cualquier causa, en las diferentes revisiones no mostró diferencias entre los pacientes con BRAF mutado y no mutado, cuando se analizaron muestras tumorales tomadas al diagnóstico inicial en diferentes estudios publicados en la literatura [29, 33, 35].

Existe poca información y discordante, sobre las implicaciones clínicas en los pacientes afectos de melanoma metastásico portadores de la mutación BRAF. Se sugiere que existe una mayor supervivencia libre de enfermedad desde el diagnóstico del tumor primario hasta la metastatización en ese grupo de pacientes. Sin embargo, se ha postulado que dicha población de pacientes tiene un peor pronóstico después del diagnóstico de la enfermedad metastásica, datos que no se ha podido confirmar en todos los estudios. Por ello el motivo de este trabajo de investigación, que no es otro que revisar si en los pacientes afectos de melanoma metastásico atendidos en nuestro centro, la presencia de la mutación BRAF puede tener un impacto en la historia natural de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La **hipótesis** del presente trabajo es determinar si los pacientes afectos de melanoma maligno metastático y portadores de la mutación de BRAF, presentan un mejor pronóstico que los pacientes que no son portadores de dicha mutación.

El **objetivo primario** de este estudio retrospectivo es analizar la supervivencia global de los pacientes afectos de melanoma metastásico tratados en el Hospital Vall d'Hebron, así como la evolución de dichos pacientes.

El **objetivo secundario** se basa en el análisis de la supervivencia global desde el diagnóstico del tumor primario hasta la muerte por cualquier causa, tanto en pacientes portadores de la mutación en BRAF como en los que no presentan dicha mutación.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN

Para poder ser evaluados en este análisis, las pacientes debían cumplir una serie de criterios de inclusión:

- Confirmación histológica de melanoma maligno de piel u origen desconocido.
- Al menos una lesión primaria o metastásica biopsiada y analizada en nuestro centro.
- Estudio mutacional del gen BRAF.
- Estadios iniciales independientes desde I al IV.
- Afectación metastásica durante la evolución de la enfermedad.
- Haber recibido al menos un tratamiento previo local o sistémico.
- Seguimiento en nuestro centro hasta el fallecimiento o hasta el último día de consulta en nuestro centro.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Melanomas primarios de mucosas y oculares.
- No haber presentado afectación a distancia durante el curso de la enfermedad.
- Tratamiento previo con inhibidores de BRAF.
- Pérdida de seguimiento del paciente en nuestro centro.

ANÁLISIS DE LOS DATOS CLÍNICOS:

Los datos demográficos de los pacientes fueron obtenidos de las historias clínicas e incluían:

- Localización del tumor primario
- Estadio inicial de la enfermedad
- Fecha de diagnóstico del tumor primario
- Fecha de diagnóstico de la enfermedad metastásica
- Localización de las metástasis
- Tratamientos con quimioterapia
- Fecha de éxitus

ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA:

Se recuperaron muestras de tejido tumoral conservado en bloques de parafina de los 25 pacientes incluidos en el estudio. Con cada muestra tumoral se realizó un estudio histopatológico con determinación del índice de Breslow, nivel de Clark, presencia o no de ulceración, recuento de número de mitosis por mm², valoración de la respuesta inflamatoria, de los microsatélites y de la invasión vascular. Para la determinación de la mutación BRAF se analizó una muestra tumoral por paciente, ya fuera del tumor primario o bien de una lesión metastásica.

ANÁLISIS MOLECULAR GENÉTICO

El análisis genómico del gen BRAF, se realizó a partir del ADN extraído de las muestras tumorales fijadas en parafina y seccionadas en láminas de 5 micrómetros. La digestión de las células se llevó a cabo mediante la utilización de proteinasa K y posteriormente se procedió a la extracción del ADN mediante la técnica de Bio Robot EZ1 de Qiagen. Se realizó la amplificación por PCR del exón 15 del gen BRAF, con la finalidad de analizar los codones 581–620 de

dicho exón. Para la amplificación se utilizaron iniciadores 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3_ (forward) y 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3_ (reverse). Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción de Bromuro. Los patrones de migración se compararon con controles positivos (BRAF mutados) y con agua destilada para comprobar la efectividad del proceso de amplificación y la presencia de contaminación. El último paso fue la reacción de secuenciación por PCR con los iniciadores arriba mencionados (forward y revers) marcados con reactivo Big Dye. La secuencia de reacciones se llevó a cabo utilizando el BigDye Terminator Cycle kit de secuenciación y los datos fueron analizados mediante el software de análisis de secuencias Sequence Analysis 3,7.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización del estudio estadístico, se dividieron los pacientes en dos cohortes en función del estado mutacional de BRAF.

El método de Kaplan-Meier se utilizó para estimar la distribución de eventos, tanto para la supervivencia global desde el diagnóstico del melanoma primario, como para la supervivencia tras el diagnóstico de metástasis.

El programa informático utilizado para la realización de los análisis estadísticos fue SPSS v. 12.0.1 para Windows. En la interpretación de los resultados se definió como significativo el valor de p bilateral inferior a 0,05.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Se incluyeron 25 pacientes afectos de melanoma metastásico tratados en el Hospital Vall d'Hebron desde 1989 a 2010. Los diagnósticos de melanoma maligno se realizaron entre 1989 y 2010 y de metástasis por melanoma entre 2004 y 2010. Las principales características de los pacientes y del tumor se recogen en las Tablas nº 1 y 2.

Tabla nº 1: Características de los pacientes.

	Sexo	Edad	Loc.	Estadío	BRAF	PLE	M1	Loc. M1	QT 1ª línea	S. PostM1	E	SG
1	1	60	C	IIB	1	29	c	SNC	TMZ	6,53	1	36
2	1	52	C	IIA	1	23	c	Pul,Os,GI	TMZ- IL2-ITF	10,80	1	34
3	1	45	C	IV	1	2	c	Pul,Os,GI	CDDP-DTIC	1,33	1	3
4	2	42	C	IB	1	135	c	Mama	VACUNAS	41,10	1	176
5	1	61	C	IIC	1	45	a	Cut,GI	TMZ	41,17	1	87
6	2	20	C	IIC	1	257	c	Pul,Hep	TMZ	7,10	1	265
7	2	52	C	IB	1	83	b	Pul	TMZ	50,10	2	133
8	1	79	C	IIIC	1	18	c	Os		9,23	2	27
9	1	44	C	IIB	1	33	c	Pul,Hep,SR		6,37	1	39
10	1	48	C	IB	1	82	c	Pul,Hep	DTIC	2,67	1	85
11	2	61	C	IIIC	1	23	c	SR		49,13	2	72
12	2	47	O/D	IV	1	0	c	Hep		101,53	2	101

	Sexo	Edad	Loc.	Estadío	BRAF	PLE	M1	Loc. M1	QT 1ª línea	S. PostM1	E	SG
13	1	51	O/D	IV	1	0	c	SNC	FM	2,73	1	3
14	2	71	C	IV	2	0	c	Ple,Gl	DTIC	4,13	2	4
15	1	53	C	IIC	2	16	a	Cut	TMZ	59,93	1	76
16	2	80	C	IIC	2	16	a	Cut	TMZ	18,27	2	34
17	1	36	C	IIIC	2	7	b	Pul	DTIC	5,47	1	13
18	2	80	C	IIIB	2	5	c	Os,Gl,Cut	TMZ-ITF	5,80	1	11
19	2	44	C	IIIB	2	49	c	Pul,Hep,Os	DTIC	6,17	2	55
20	2	65	C	IIC	2	29	c	Ren,Cut,Gl	TMZ	38,07	1	67
21	1	51	A	IIA	2	43	c	Pul,Sc,Gl	DTIC-OBL	14,47	1	57
22	1	56	A	IB	2	130	a	Gl	DTIC	34,00	1	164
23	2	53	C/C	IV	2	0	c	Pul,Hep	DTIC	10,23	2	10
24	1	60	O/D	IV	2	0	c	Hep	TMZ	21,40	2	21
25	1	72	O/D	IV	2	0	c	SNC	DTIC	13,67	1	15

Sexo: 1: hombre;2: mujer

Loc. (Localización): C: cutáneo; A: acral; C/C: cabeza y cuello; O/D: origen desconocido

BRAF: 1: BRAF mutado; 2: BRAF no mutado

PLE: Periodo libre de enfermedad entre diagnostico del primario y la enfermedad metastásica (meses)

M1: a: M1a; b: M1b; c: M1c

Loc.M1 (Localización de las metástasis): Cut: cutáneo; Gl: ganglionar; Os: óseo; SNC: sistema nervioso central; Pul: pulmón; Hep: hígado; SR: suprarrenal; Ple: pleural; Ren: renal; SC: subcutáneo

S.Post-M1: Supervivencia desde el diagnostico de enfermedad metastásica hasta la muerte (meses)

E (Exitus) 1: Si; 2: No

SG: Supervivencia desde el diagnostico inicial hasta la muerte o hasta el último control en consultas (meses)

Tabla nº2: Características de los pacientes.

Características	Total	Pacientes BRAF mutado	Pacientes BRAF WT
Edad diagnostico, mediana, años(limites)	53 (20 – 80)	51 (20 – 79)	58 (36 – 80)
Sexo: mujeres/hombres	11/14	5/8	6/6
Localización tumor primario: numero pacientes	Cutáneos: 21 Origen desconocido: 4	Cutáneos: 11, Origen desconocido: 2	Cutáneos: 10 (2 acrales, 1 cabeza), Origen desconocido: 2
Estadio al diagnostico, numero pacientes	I: 4 II: 9 III: 5 IV: 7	I: 3 II:5 III: 2 IV: 3	I: 1 II: 4 III: 3 IV: 4
Localización metástasis		Piel y ganglionar: 4; Hepáticas: 4; Oseas: 4; Pulmonares:5; SNC: 2; Mama: 1; Suprarr: 1	Piel y Ganglionar: 5; Hepáticas: 3; Oseas: 2; Pulmonares:4; SNC: 1; Pleura: 1; Renal: 1
Tipos 1ª línea QT	TMZ: 10 DTIC: 9 FM: 1 Vacunas: 1	TMZ: 5 DTIC: 2 FM: 1 Vacunas: 1	TMZ:5 DTIC: 7 FM: 0
Éxitus	21	9	7

La mediana de edad en el momento de diagnóstico era de 51 años para el grupo portador de la mutación BRAF (límites 20 - 79) y de 58 años para el grupo de BRAF no mutados (límites 38 - 80). En cuanto a la distribución en función del sexo, se incluyeron 14 hombres y 11 mujeres afectados de melanoma maligno metastásico. Entre la población masculina 8 pacientes eran portadores mutación BRAF y 6 pacientes presentaban BRAF nativo. En la población femenina 5 pacientes eran portadoras de la mutación de BRAF y 6 pacientes no presentaban alteración en el gen BRAF.

CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

El material disponible para el estudio comprendía 14 muestras de melanoma cutáneo primario y 11 muestras de tejidos metastásicos. Entre las localizaciones metastásicas se obtuvieron 4 biopsias ganglionares, 4 muestras de metástasis hepáticas, una bronquial, una pleural y una suprarrenal. Dichos datos están reflejados en la Tabla nº 3.

Tabla nº3: Características de las biopsias:

Origen:	Total	BRAF mutado	BRAF WT
Cutánea	14	6	8
Ganglionar	4	3	1
Bronquio	1	1	0
Hepáticas	4	2	2
Pleural	1	0	1
Suprarrenal	1	1	0

ESTATUS MUTACIONAL DE BRAF

De los 25 pacientes incluidos en el estudio, 13 pacientes (52%) presentaban mutación del gen BRAF y 12 pacientes (48%) presentaban gen BRAF no mutado. Las muestras de las biopsias en las que se determinó el estatus mutacional de BRAF podían ser tanto de localizaciones del tumor primario como de los diferentes lugares de afectación metastásica (Tabla nº 3). A la hora de analizar el estatus mutacional en función de la localización de la muestra se obtuvieron los siguientes resultados: de las 14 biopsias de tejido cutáneo, 6 resultaron ser BRAF mutadas y 8 BRAF no mutadas, mientras que de las 4 muestras ganglionares, 3 fueron BRAF mutadas y una resultó BRAF no mutada. De entre las cuatro biopsias de metástasis hepáticas, 2 fueron BRAF mutadas y 2 BRAF no mutadas. En el resto de localizaciones: una muestra de biopsia pleural era BRAF no mutada y una biopsia de la metástasis suprarrenal era BRAF mutada. Estos datos se encuentran representados en las Figuras nº 1 y 2.

ESTADIFICACIÓN DE LOS PACIENTES

En cuanto al estadio al diagnóstico de la enfermedad, de los 25 pacientes incluidos en el estudio, 4 pacientes presentaban melanoma estadio I al diagnóstico (75% de los pacientes eran portadores de mutación BRAF y 25% de los pacientes eran BRAF no mutados), 9 pacientes presentaban melanoma estadio II (55% de los pacientes eran portadores de la mutación BRAF y 45% de los pacientes eran BRAF no mutados), 5 pacientes presentaban melanoma estadio III (40 % de los pacientes eran portadores de la mutación BRAF y 60% de los pacientes eran BRAF no mutados) y finalmente 7 pacientes presentaban melanoma estadio IV (42% de los pacientes eran portadores de la mutación BRAF y 58% de los pacientes eran BRAF no mutados).

LOCALIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD AL DIAGNÓSTICO

Dentro de las diferentes localizaciones en el momento del diagnóstico de melanoma primario, cuatro pacientes presentaban melanoma maligno de origen desconocido y 21 pacientes presentaban melanoma maligno de origen cutáneo. Entre los pacientes con melanoma cutáneo, 11 pacientes (52%) eran portadores de mutación BRAF mientras que 10 pacientes (48%) no presentaban dicha mutación.

Las localizaciones anatómicas de los tumores primarios cutáneos eran mayoritariamente en tronco y extremidades, excepto dos pacientes que presentaban melanoma maligno acral y uno localizado a nivel de cuero cabelludo. Se objetivó que tanto los dos melanomas acrales, como el originario a nivel de cuero cabelludo, no eran portadores de la mutación de BRAF.

Entre los cuatro melanomas de origen desconocido, dos pacientes presentaban la mutación de BRAF y dos pacientes eran BRAF no mutados.

LOCALIZACIONES DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA

Para la clasificación de los pacientes con enfermedad metastásica, cuatro pacientes se clasificaron como estadio M1a (con metástasis cutáneas y ganglionares, y niveles de LDH normales), uno de ellos con mutación de BRAF y 3 pacientes sin la mutación de BRAF. Dos pacientes se clasificaron como estadio M1b (metástasis pulmonar con niveles de LDH normales), uno portador de la mutación de BRAF y otro no. El resto de pacientes (19) presentaban estadio M1c con metástasis en diferentes localizaciones tal como se muestra en la Tabla nº 1.

ESQUEMAS DE TRATAMIENTO

Los pacientes recibieron diferentes esquemas de quimioterapia (QT) a lo largo de la evolución de la enfermedad, tal como se muestra en la Tabla nº1. Como primera línea de tratamiento para enfermedad metastásica, 21 pacientes (9 pacientes portadores de mutación de BRAF y 12 pacientes con BRAF no mutado) recibieron los siguientes esquemas: 10 pacientes realizaron tratamiento con Temozolamida (8 en monoterapia y 2 en combinación), 9 pacientes fueron tratados con Dacarbacina (7 en monoterapia y 2 en combinación), un paciente fue tratado con vacunas heterólogas y otro paciente recibió tratamiento con Fotemustina.

TIEMPO A LA PROGRESIÓN Y SUPERVIVENCIA GLOBAL:

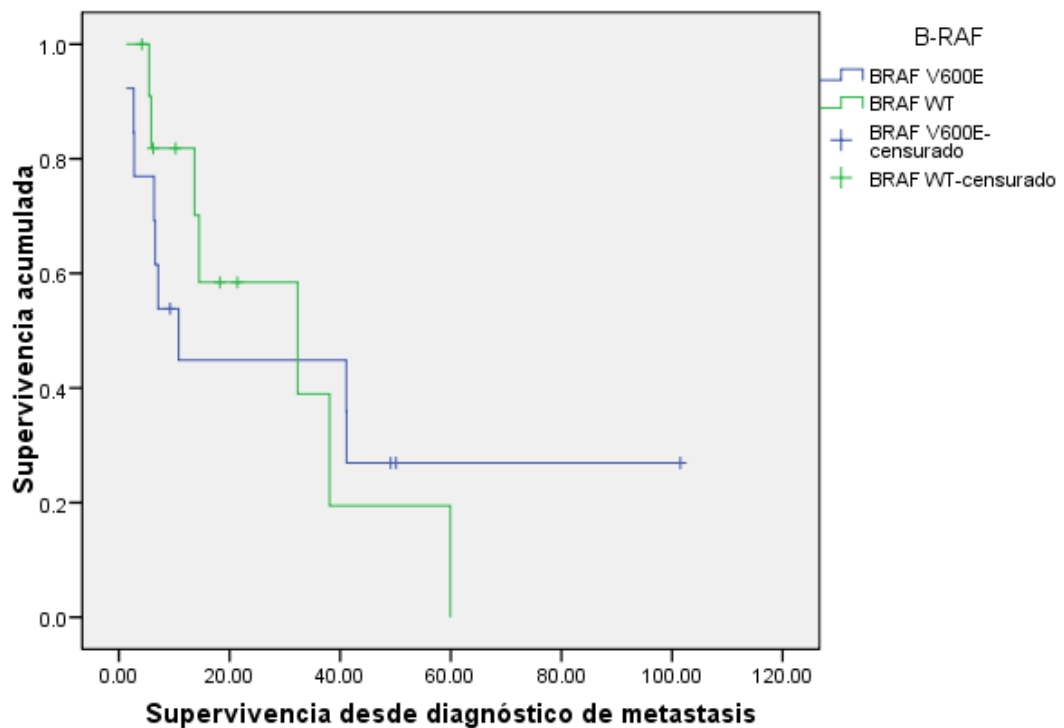
Se definió como supervivencia global tras el diagnóstico de la enfermedad metastásica (S.post-M1) como tiempo comprendido entre el diagnóstico de la enfermedad avanzada hasta la muerte por cualquier causa. A su vez se definió supervivencia global (SG) como tiempo entre el diagnóstico de tumor primario hasta la muerte por cualquier causa.

La mediana de tiempo desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la aparición de enfermedad metastásica fue de 45,4 meses en los pacientes portadores de mutación de BRAF y de 29,4 meses en el grupo de pacientes sin mutación de BRAF. Dichos hallazgos no resultaron estadísticamente significativos ($p=0,304$).

Para analizar la supervivencia desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta el fallecimiento del paciente (S.post-M1), se realizó el

análisis de supervivencia tal y como se muestra en la Figura nº 3. Para los pacientes afectos de melanoma metastático portadores de mutación de BRAF se obtuvo una mediana de S.post-M1 de 10,8 meses y para los pacientes sin la mutación de BRAF la mediana de S.post-M1 era de 32,2 meses (HR 1,04, IC 95% 0,37 – 2,87; $p=0,944$).

Figura nº 3: S.post-M1 Supervivencia desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta la muerte por cualquier causa.



MEDIANAS:

BRAF V600E: 10,8 meses

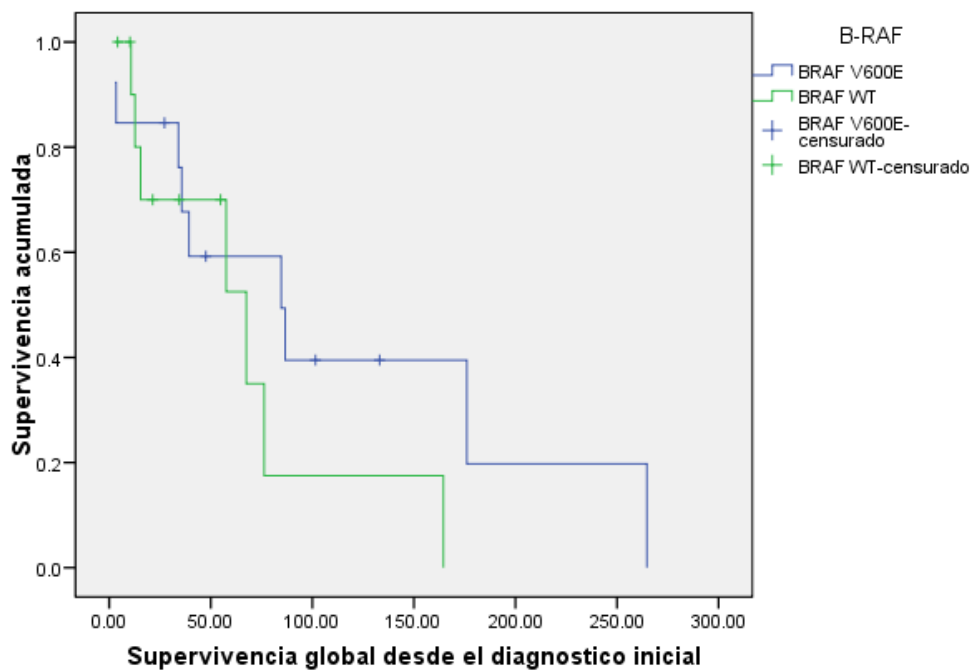
BRAF WT: 32,3 meses

P = 0,94

HR 1,04 (IC 95% 0,37 – 2,87)

En la Figura nº 4 se muestran los datos de supervivencia global desde el diagnóstico inicial del melanoma primario. Objetivamos que los pacientes afectos de melanoma metastásico con mutación del gen BRAF presentaban una supervivencia global de 84,7 meses, mientras que para los pacientes con BRAF no mutado dicha supervivencia era de 67,5 meses. (HR 0,55, IC 95% 0,186 – 1,619; P=0,271).

Figura nº 4: SG Supervivencia global desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la muerte o el último control.



MEDIANAS:
BRAF V600: 84,7 meses
BRAF WT: 67,5 meses
P=0,271
HR: 0,549 (IC 95% 0,186 - 1,619)

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio sugieren que los pacientes afectos de melanoma metastásico portadores de la mutación del gen BRAF presentan unas características clínico-patológicas distintas a los pacientes afectos de melanoma metastásico, no portadores de dicha mutación. En concreto se han objetivado diferencias en cuanto a la edad al diagnóstico del tumor primario, el estadio al diagnóstico del tumor primario, así como en la supervivencia libre de enfermedad hasta el desarrollo de la enfermedad metastásica y en la supervivencia global tras el diagnóstico de la enfermedad avanzada. Cabe destacar que dichas diferencias en este estudio han sido numéricas y no estadísticamente significativas, posiblemente debido por una parte al pequeño número muestral así como debido al carácter retrospectivo del estudio.

Se han reportado más de 75 subtipos diferentes de mutaciones del gen BRAF en la literatura, siendo la mutación V600E la que representa entre el 74% y el 90% de todas las mutaciones descritas [41, 45, 47]. En nuestro estudio llevamos a cabo el análisis mediante secuenciación por PCR, únicamente de la mutación más prevalente (V600E). La frecuencia de mutaciones en el gen BRAF en los pacientes con melanoma maligno metastásico reportada en los diferentes estudios varía entre el 41 % y el 55 % [33, 35]. Sin embargo, en los estudios que incluían en su análisis tanto muestras de tumores primarios como de tumores metastásicos, la presencia de la mutación del gen BRAF resultó ser mayor, con una frecuencia de entre 48 % y el 66,3% [29, 44]. Nuestro análisis conjunto de muestras de tumores primarios y de lesiones metastásicas (donde cada muestra se corresponde a un paciente analizado) mostró una frecuencia de melanomas con mutación de BRAF V600E del 52%, dato que se ajusta a los resultados reportados en la literatura.

A su vez, en los diferentes estudios publicados en la literatura, se sugieren múltiples diferencias clínicas entre los pacientes portadores de la mutación de BRAF respecto a los BRAF no mutados. Una de las diferencias a destacar es la edad al diagnóstico del tumor primario. Se ha reportado, para los pacientes portadores de mutación de BRAF, una media de edad al diagnóstico del melanoma maligno de entre 47,3 y 56 años, mientras que para los pacientes BRAF no mutados la media de edad al diagnóstico varía entre 53,9 y 63 años [30, 45-47]. Por ello, se ha propuesto que la edad menor de 55 años podría ser un factor predictivo para presentar estado BRAF mutado [31]. Los datos obtenidos en nuestro centro corroboran que los pacientes afectos de melanoma y portadores del gen BRAF mutado se diagnostican a unas edades más tempranas en comparación con los pacientes BRAF no mutados, con una mediana de edad de 51 y 58 años respectivamente.

Otra diferencia relevante hace referencia al papel etiológico del daño cutáneo como factor predisponente para el desarrollo del melanoma. El daño cutáneo crónico, habitualmente causado por la exposición solar, es un factor ampliamente estudiado y relacionado con el desarrollo del melanoma maligno. Sin embargo, se ha sugerido que los melanomas con mutaciones de BRAF no están relacionados con el daño cutáneo ya que su aparición es poco frecuente en zonas con alta exposición solar como son las partes acrales y la zona de la cabeza y el cuello [30, 46, 47]. Paralelamente se ha reportado que los nevus congénitos, los cuales no se encuentran relacionados con la exposición solar, carecen de mutaciones de BRAF, y sin embargo los nevus adquiridos, asociados de manera indirecta con radiación solar en la infancia, normalmente expresan mutación de BRAF [41, 48]. Con dichos datos ha surgido la hipótesis de que tanto los nevus adquiridos como los melanomas BRAF mutados tendrían lugar sobre todo en personas susceptibles a las radiaciones ultravioleta (UV), mientras que las personas resistentes al daño solar no desarrollarían melanomas hasta alcanzar unos niveles elevados de exposición a la radiación UV; estos melanomas a su vez expresarían menos frecuentemente la mutación de BRAF. En nuestro estudio observamos como

ninguno de los pacientes portadores de BRAF mutado presentaba melanoma acral o de la cabeza y el cuello, lo que estaría acorde con lo descrito anteriormente, aunque una de las limitaciones para corroborar con exactitud este dato es el pequeño número de pacientes incluidos en el estudio. Sin embargo, no pudimos establecer una relación entre el grado de exposición solar y las características genómicas de los melanomas malignos, debido a la falta de datos clínicos, lo cuales no se hallan recogidos con exactitud en la historia clínica de los pacientes.

En cuanto a la relación entre la presencia de mutación del gen BRAF y su implicación en la evolución clínica de la enfermedad (intervalo libre y patrón de recurrencia) así como en el pronóstico de los pacientes con diagnóstico de melanoma (supervivencia global), los datos reportados no son concluyentes. Kumar *et ál.* [34] en un análisis retrospectivo con 38 pacientes, describe una supervivencia libre de recurrencia metastásica de 12 meses para los pacientes BRAF mutados respecto a 5 meses para los pacientes BRAF no mutados, siendo esta diferencia no estadísticamente significativa. Sin embargo, otros estudios no mostraron relación entre el estado mutacional de BRAF y el tiempo libre de enfermedad recurrente [29, 33, 43, 45]. En nuestro estudio, observamos como los pacientes afectados de melanoma BRAF mutado comparado con el grupo de pacientes BRAF no mutado presentan una mayor supervivencia libre de recurrencia, siendo de 45,4 y 29,4 meses respectivamente, aunque dichos resultados no son estadísticamente significativos.

En cuanto al análisis de supervivencia global de nuestro estudio, constatamos una mayor mediana de supervivencia desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la muerte por cualquier causa en los pacientes con presencia de mutación de BRAF de 84,7 meses, respecto a los 67,5 meses que se objetiva en los pacientes BRAF no mutados. Se trata de una diferencia numérica, sin diferencia estadísticamente significativa, probablemente debido a

un reducido tamaño muestral. Otras revisiones tampoco han demostrado un claro impacto negativo en la supervivencia global en pacientes afectos de melanoma y portadores de la mutación de BRAF [33, 35]. Houben *et ál.* [29] en el análisis de 114 muestras de tumor cutáneo primario objetivaron que la supervivencia global de dichos pacientes no variaba según la presencia o la ausencia de la mutación de BRAF. El mismo estudio también analizó los pacientes cuyas muestras tumorales procedían de tejidos metastásicos. Dentro de este segundo subgrupo se incluyeron los pacientes con un diagnóstico de melanoma estadio IV al debut de la enfermedad maligna y éstos mostraron una supervivencia global menor si eran portadores de la mutación de BRAF cuando se compararon con los pacientes BRAF no mutados. Dichos datos sobre la supervivencia global desde el diagnóstico inicial son difícilmente comparables con los resultados obtenidos en nuestro análisis, debido a la diferencia en el tamaño muestral así como por la ausencia, en nuestro estudio, de diferenciación entre los pacientes cuyas muestras procedían del tumor primario y los pacientes cuyas muestras se obtuvieron de tejido metastásico.

A pesar de estas limitaciones de nuestro estudio, nuestros datos sugerirían una tendencia hacia un peor pronóstico en los pacientes afectos de melanoma metastásico (estadio IV) al debut portadores de la mutación de BRAF. Así, de los 7 pacientes incluidos en nuestro estudio afectos de melanoma maligno estadio IV al diagnóstico, tres presentaban el gen BRAF mutado y dichos pacientes mostraron unas supervivencias de 3 meses, 3 meses y 101 meses, respectivamente; los otros cuatro pacientes que presentaban el gen BRAF no mutado mostraron unas supervivencias globales de 4 meses, 10 meses, 15 meses y 21 meses, respectivamente. En nuestro estudio, sin embargo, el análisis de supervivencia global del total de los 25 pacientes analizados, incluyendo estadios I-IV, mostró una supervivencia global superior en los pacientes portadores de la mutación de BRAF comparados con los BRAF no mutados. Ésta tendencia a una mejor supervivencia global en los pacientes BRAF mutados comparado con pacientes BRAF no mutados cuando se estudian en conjunto (incluyendo estadios de I a IV), probablemente se deba

a que la muestra analizada incluía un mayor número de pacientes con estadios iniciales al debut de la enfermedad, en los que el pronóstico no dependería tan claramente del estado mutacional de BRAF, si no del propio estadio tumoral.

Otro objetivo de nuestro estudio fue analizar la supervivencia de nuestros pacientes tras el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta la muerte por cualquier causa. Este análisis mostró una mediana de supervivencia en el grupo de pacientes BRAF mutado vs. BRAF no mutado de 10,8 meses vs. 32,2 meses respectivamente, sin ser estos resultados estadísticamente significativos (HR 1,04). Si nos referimos a la literatura, los datos reportados al respecto no son concluyentes, pero también sugieren una peor supervivencia de los pacientes portadores de la mutación del gen BRAF. Houben *et ál.* [29], en su análisis describieron como la presencia de mutación BRAF en melanoma metastásico confiere una peor supervivencia tras el diagnóstico de enfermedad metastásica reseca. La misma tendencia se observó en el estudio de Ugurel *et ál.* [35] que sugería un peor pronóstico de pacientes con melanoma maligno metastásico portadores de mutación BRAF comparado con los BRAF no mutados (8 meses vs. 11,8 meses, respectivamente). Como hemos comentado anteriormente, los datos en la literatura no llegan a ser concluyentes respecto a este hecho, así según lo reportado por Chang *et ál.* ambos grupos de pacientes no presentaban diferencias pronósticas significativas. Como posible explicación de estos resultados dispares sería la diferente proporción entre los estudios de pacientes con afectación visceral (M1c), lo que conferiría *per se* un peor pronóstico, independientemente del estado mutacional. Además, en los estudios de Houben *et ál.* y Ugurel *et ál.*, el número de pacientes con enfermedad visceral era inferior al del estudio de Chang *et ál.*, confiriendo así de manera indirecta, un mejor pronóstico a los pacientes con menor carga tumoral.

Por último, y en la misma línea que los estudios publicados por Houben *et ál.* y Ugurel *et ál.*, el estudio prospectivo publicado por Long *et ál.* [45] que incluía una mayoría de pacientes afectados de melanoma estadio IV por M1c (58% en el grupo de BRAF mutados y 56% en el grupo de BRAF no mutados) reportó una supervivencia global tras el diagnóstico de enfermedad avanzada significativamente más corta en los pacientes portadores de la mutación de BRAF y que no habían sido tratados con inhibidores de BRAF comparado con los pacientes BRAF no mutados (5,7 meses vs. 8,5 meses, respectivamente). Por tanto es el único estudio que confirma de forma prospectiva e incluyendo la mayoría de pacientes con afectación visceral, un peor pronóstico de los pacientes afectados de melanoma metastásico y portadores de mutación de BRAF comparado con los BRAF no mutados.

Nuestro análisis, también incluía una mayoría de pacientes con afectación sistémica orgánica; de los 25 pacientes incluidos, 19 pacientes presentaban una afectación metastásica M1c, 4 una afectación M1a y 2 una afectación M1b. Como hemos descrito con anterioridad, en nuestro estudio la mediana de supervivencia tras el diagnóstico de la enfermedad metastásica era inferior en el grupo de pacientes BRAF mutado vs. el grupo de pacientes BRAF no mutado. Sin embargo, se trata de una diferencia numérica y no estadísticamente significativa debido al bajo número de pacientes incluidos en el estudio.

Conviene remarcar la naturaleza retrospectiva de este estudio, cuyos resultados están sujetos a distintos sesgos propios de este tipo de análisis, en el cual la presencia de factores de confusión y de interacción no son correctamente analizados. Otra limitación es el tamaño muestral con un número reducido de pacientes del estudio. Cabe destacar que a pesar de las limitaciones mencionadas anteriormente, los resultados obtenidos son superponibles a los de otros estudios publicados en la literatura.

Por todo ello y tras la exhaustiva revisión de la literatura, se puede postular que las mutaciones de BRAF en melanoma maligno confieren un peor pronóstico en aquellos pacientes con estadios avanzados de enfermedad, pero se necesitarían más estudios para poder confirmar dicha teoría puesto que los estudios actuales presentan un número reducido de pacientes, las características de los mismos son heterogéneas (se incluyen tanto pacientes con enfermedad primaria como diseminada) y la disponibilidad en cuanto al tipo de biopsias es diferente entre cada uno de ellos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que:

1. Los pacientes afectados de melanoma maligno portadores de la mutación en el gen BRAF respecto a los que no presentan dicha mutación debutan con el tumor primario a una edad más temprana.
2. Los pacientes con melanoma maligno portadores de la mutación en el gen BRAF respecto a los que no presentan dicha mutación debutan con unos estadios más bajos.
3. El intervalo libre de enfermedad desde el diagnóstico de tumor primario hasta la recurrencia es más largo para el grupo de pacientes portadores de la mutación de BRAF comparado con los pacientes BRAF no mutados, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.
4. La supervivencia global desde el diagnóstico del melanoma primario es más larga para el grupo de pacientes portadores de la mutación de BRAF comparado con los pacientes BRAF no mutados, aunque estas diferencias tampoco son estadísticamente significativas.
5. La supervivencia global desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica es más corta para los pacientes con mutación de BRAF comparado con los BRAF no mutados, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010 Oct. 60(5): p. 277-300.
2. DeVita H., Rosenberg, *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 8 ed. 2008.
3. Ries LA, et al. SEER Cancer Statistics Review 1975-2007. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/results_merged/sect_16_melanoma_skin.pdf.
4. Ródenas JM, et al, Melanocytic nevi and risk of cutaneous malignant melanoma in southern Spain. *Am J Epidemiol*, 1997 Jun. 145(11): p. 1020-9.
5. Dummer R, Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 2010. 21(suplement 5): p. 194-197.
6. Jemal A, et al, Center MM, Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, mar-apr. 61(2): p. 69-90.
7. Rigel DS, Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg.*, 2010 Dec. 29(4): p. 204-9.
8. Manola J, et al., Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol*, 2000. 18(22): p. 3782-93.
9. Gilchrest BA, et al., The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *N Engl J Med*, 1999. 340: p. 1341-1348.
10. Hemminki K, et al., A population-based study of familial cutaneous melanoma. *Melanoma Res*, 2001. 2: p. 133-40.
11. Miller AJ, Mihm MC Jr., Melanoma. *N Engl J Med*, 2006. 355: p. 51-65.
12. Kirkwood, J.M., et al., Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*, 1996. 14(1): p. 7-17.
13. Kirkwood, J.M., et al., High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol*, 2000. 18(12): p. 2444-58.
14. Kirkwood, J.M., et al., High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol*, 2001. 19(9): p. 2370-80.
15. Grenn RJ, S.L., Systemic treatment of metastatic melanoma with chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1998. 22: p. 7-10.
16. Chapman PB, et al., Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1999. 17: p. 2745-2751.
17. Middleton MR, et al., Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000. 18: p. 158-166.
18. Avril, M.F., et al., Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol*, 2004. 22(6): p. 1118-25

19. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24:4738-45
20. Cohen, M.H., J.R. Johnson, and M.R. Middleton, Temozolomide for advanced, metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2000. 18(10): p. 2185.
21. Patel P.M., Suciú S., Mortier L., et al, Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032)., *Eur J Cancer*, 2011. 47(10): p.1476-83.
22. Agarwala, S.S., et al., Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol*, 2004. 22(11): p. 2101-7.
23. Tarhini, A.A. and S.S. Agarwala, Management of brain metastases in patients with melanoma. *Curr Opin Oncol*, 2004. 16(2): p. 161-6.
24. Stephen Hodi F., O'Day S. et al. , Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2010. 363 : p. 711-23
25. Robert C, Thomas L. et al., Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2011. 364: p. 2517-26
26. 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 mutationpositive melanoma. *J Clin Oncol* 2011; 29:Suppl:8509. abstract.
27. Chapman,P., Hauschild.A., Robert,C., Haanen,J., Ascierto,P.,Larkin, J. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine*.2011;364:2507-16.
28. Curtin JA, et al., Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.*, 2005. 353(20): p. 2135-7.
29. Houben R, et al., Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog*, 2004. 3(1): p. 6.
30. Liu W, et al., Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(4): p. 900-5.
31. Viros A, et al., Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*, 2008. 5(6): p. e120.
32. Thomas NE, et al., Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(5): p. 991-7.
33. Chang DZ, et al., Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 2004. 2(1): p. 46.
34. Kumar R, et al., BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res.*, 2003. 9(9): p. 3362-8.
35. Ugurel S, et al., B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS One.*, 2007. 2(2): p. e236.
36. Davies H, et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002. 417(6892): p. 949-54.
37. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC et al, NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 2011 doi: 10.1002/cncr.26724. [Epub ahead of print]

38. J. A. Jakob, R. L. Bassett, C. S. Ng, A. J. F. Lazar, G. C. Alvarado, M. L. Rohlfs et al., Clinical characteristics and outcomes associated with BRAF and NRAS mutations in metastatic melanoma. [Abstract nº 8500], 2011 ASCO Annual Meeting
39. Michaloglou C, et al., BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 2005. 436(7051): p. 720-4.
40. Chang F, et al., Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*, 2003. 22(3): p. 469-80.
41. Pollock PM, et al., High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.*, 2003. 33(1): p. 19-20.
42. Libra M, et al., Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell Cycle.*, 2005. 4(10): p. 1382-4.
43. Shinozaki M, et al., Incidence of BRAF Oncogene Mutation and Clinical Relevance for Primary Cutaneous Melanomas. *Clinical Cancer Research*, 2004. 10: p. 1753-1757.
44. Dong J, et al., BRAF Oncogenic Mutations Correlate with Progression rather than Initiation of Human Melanoma. *Cancer Research*, 2003. 63(14): p. 3883-5.
45. Long GV, et al., Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic BRAF in Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2011. 29(10): p. 1239-46.
46. Hacker E, et al., The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: Findings from an Australian population. *J Invest Dermatol*, 2010. 130:p. 241-248
47. Thomas NE, et al., RAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* 2006. 16(2): p. 97-103.
48. Bauer J., Congenital Melanocytic Nevi Frequently Harbor NRAS Mutations but no BRAF Mutation. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007. 127: p. 179–182.