

Caracterização da População com Mutação BRAF V600 nos Doentes com Melanoma Cutâneo Metastizado num Centro Terciário

Maria Mendonça-Sanches¹, Miguel Apalhão¹, Pedro Vale-Fernandes², Miguel Rito³, Joaquina Costa-Rosa³, Cecília Moura⁴

¹Departamento de Dermatovenereologia, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal

²Departamento de Dermatovenereologia, Centro Hospitalar do Funchal, Madeira, Portugal

³Departamento de Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

⁴Departamento de Dermatologia, Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

RESUMO – Introdução: O melanoma, ainda que represente apenas 5% das neoplasias cutâneas, é o tumor desse órgão com maior taxa de mortalidade. O constante desenvolvimento de novos fármacos, nomeadamente aqueles que têm como alvo terapêutico a proteína B-Raf, aumentou significativamente a sobrevida global dos doentes. Até à data, vários estudos avaliaram as correlações clínico-patológicas com esta mutação; no entanto, não há publicado nenhum estudo referente à população portuguesa. **Material e Métodos:** No presente trabalho, os autores investigaram a existência de correlações clínico-patológicas com a presença ou ausência de mutação BRAF, numa população de doentes com melanoma cutâneo metastizado, com vista à identificação de fatores de prognóstico relacionados com esta via de sinalização celular no melanoma. **Resultados:** Foram avaliados os processos de 197 doentes com melanoma metastizado e mutação BRAF testada, observados no Serviço de Dermatologia do IPOLFG entre janeiro de 2012 e dezembro de 2016. A mutação BRAF foi documentada em 46,7% (n=92) dos doentes, 60% dos quais (n=56) eram do sexo masculino. Cinquenta e dois por cento (n=48) dos tumores primários estavam localizados no tronco, o que sugere a associação da mutação com a exposição solar intermitente. Em 40% dos doentes (n=79) a metastização ocorreu em múltiplos locais anatómicos. A percentagem de doentes com metastização num único local anatómico foi de 60% (n=118), sendo os locais mais frequentemente envolvidos as cadeias ganglionares locoregionais (36%, n=43) e o pulmão (26,6%, n=25). **Conclusão:** Os resultados apresentados não revelaram diferenças na população portuguesa estudada, estando de acordo com aqueles documentados para outras populações e descritos na literatura.

PALAVRAS-CHAVE – Melanoma/genética; Mutação; Neoplasias da Pele; Proteínas Proto-Oncogénicas B-raf.

Characterization of the Population with BRAF V600 Mutation in Patients with Metastatic Cutaneous Melanoma in a Tertiary Center

ABSTRACT – Introduction: Although corresponding to only 5% of cutaneous neoplasms, melanoma is the tumor of this organ with the highest mortality rate. The constant development of new drugs, particularly those targeting the B-Raf protein, has significantly increased overall patient survival. To date, several studies have evaluated the clinical-pathological correlations with this mutation. However, no study has been published regarding the Portuguese population. **Material & Methods:** In the present study, the authors investigated the existence of clinico-pathological correlations with the presence or absence of BRAF mutation in a population of patients with metastatic cutaneous melanoma, in order to identify prognostic factors related to this cell signaling pathway. **Results:** A total of 197 melanoma patients' clinical processes with BRAF mutation tested, observed at the IPOLFG Dermatology Service between January 2012 and December 2016, were evaluated. The BRAF mutation was documented in 46.7% (n=92) of the patients, 60% of which (n=56) were male. Fifty-two percent (n=48) of the primary tumors were located in the trunk, suggesting the association of the mutation with intermittent sun exposure. In 40% of patients (n=79) metastasis occurred

Correspondência: Maria Mendonça Sanches

Departamento de Dermatovenereologia

Hospital de Santa Maria

Av. Prof. Egas Moniz

1649-035 Lisboa, Portugal

Tel.: +351 21 780 5000

E-mail: mariasanches@hotmail.com

DOI: <https://dx.doi.org/10.29021/spdv.78.1.1150>

Recebido/Received
2019/12/15

Aceite/Accepted
2020/03/24

Publicado/Published
2020/04/--

© Autor (es) (ou seu (s) empregador (es)) e Revista SPDV 2020. Reutilização permitida de acordo com CC BY-NC. Nenhuma reutilização comercial.

© Author(s) (or their employer(s)) and SPDV Journal 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use.

Artigo Original

at multiple anatomical sites. The percentage of patients with metastasis in a single anatomical site was 60% ($n = 118$), with the most frequently involved sites being locoregional ganglion chains (36%, $n=43$) and lung (26.6%, $n=25$). **Conclusion:** The results presented did not reveal differences in the studied Portuguese population, in agreement with those documented for other populations and described in the literature.

KEYWORDS – Melanoma/genetics; Mutation; Proto-Oncogene Proteins B-raf; Skin Neoplasms/genetics.

INTRODUÇÃO

O melanoma representa apenas cerca de 5% das neoplasias cutâneas, mas é responsável pela grande maioria das mortes relacionadas com cancro cutâneo.¹ Trata-se de uma neoplasia cutânea agressiva, com mortalidade global de 20%. Em doentes com doença irresssecável ou metastática, a sobrevida ao fim de um ano é cerca de 25%.^{2,3}

Durante décadas, a dacarbazina era considerada a quimioterapia sistémica *standard* no doente com melanoma avançado, verificando-se uma taxa de resposta de 7%-12% e uma sobrevida de 64% aos 6 meses. A sobrevida global média era de 6-8 meses.³⁻⁷ Os estudos moleculares no melanoma e noutros tumores permitiram a identificação dos mecanismos de sinalização, tendo sido caracterizadas, nomeadamente, a via das fosfocinases ativadas por mitogénio (proteínas c-KIT, B-Raf, MEK e ERK) e a via PI3K-AKT (proteínas PTEN e mTOR).⁸⁻¹² As mutações da proteína B-Raf, presentes em cerca de 33% a 47% dos casos de melanoma primário¹³⁻²⁵ e em 41%-55% dos casos de melanoma metastático,²⁶⁻²⁹ induzem a ativação constitutiva da via de sinalização extracelular MAPK (fosfocinases ativadas por mitogénio), promovendo a proliferação das células tumorais. Têm-se vindo a relatar mutações genéticas diferentes para diferentes tipos histológicos de melanoma e para melanomas de diferentes localizações, associadas ou não a dano actínico intermitente e na infância. A compreensão destes mecanismos de sinalização molecular permitiu o desenvolvimento de novos fármacos, com taxas de resposta e sobrevida significativamente superiores às obtidas no melanoma, com a quimioterapia convencional.²⁰⁻²³ Recentemente, estes mesmos fármacos têm também sido utilizados, num contexto de adjuvância, nos doentes com melanoma em estadio III, com um aumento bem documentado na sobrevida global.¹⁴⁻²⁹

Até à data, vários estudos investigaram a eventual existência de correlação entre os dados clínico-patológicos e a presença da mutação BRAF, sugerindo uma associação dessa mutação com a exposição solar intermitente.^{30,31} Neste estudo, pretendemos avaliar a frequência dessa mutação na população portuguesa e investigar a presença de eventuais correlações clínico-moleculares em 197 doentes com melanoma metastizado, seguidos no Instituto Português de Oncologia de Lisboa (IPOLFG), nos quais o estudo do *status* BRAF foi efetuado.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo retrospectivo que avaliou os doentes observados no Serviço de Dermatologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG) e testados

para a mutação BRAF de janeiro de 2012 até dezembro de 2016. Foram avaliados os processos dos doentes, tendo sido registados: a idade à data da excisão da lesão primária, género, localização, tipo histológico, espessura tumoral (Breslow), presença de ulceração, presença de mitoses, estadio da American Joint Committee on Cancer - AJCC (7ª edição) inicial e localização da primeira metástase à distância.

A pesquisa da mutação foi efetuada pelo teste cobas® (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test), no Serviço de Anatomia Patológica do IPOLFG, preferencialmente utilizando tecido metastático. Este teste consiste num ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real, sendo utilizado para avaliar o *status* da mutação BRAF no ADN isolado de tecido tumoral fixado em formol e conservado em parafina. Foi desenhado para detetar a mutação BRAF V600E predominante com elevada sensibilidade. Os estudos não clínicos e clínicos, com análises de sequenciação retrospectivas, demonstraram que o teste também deteta com menor sensibilidade as mutações menos frequentes BRAF V600D e V600K.

No que respeita a análise estatística dos dados apresentados, foram calculados os valores de *p* e a significância estatística da distribuição dos resultados em cada parâmetro, sendo para tal utilizado o programa SPSS® versão 21.

RESULTADOS

Foram avaliados os processos de 197 doentes, 92 do sexo feminino e 105 do sexo masculino, com uma média de idades de $57,6 \pm 14,8$ anos (variando entre os 15 e os 82 anos), correspondendo ao total de doentes submetidos ao teste cobas®, no intervalo de tempo acima referido.

Em 92 casos de melanoma (46,7%) foi detetada a mutação BRAF. A análise comparativa entre o *status* BRAF e os dados demográficos e clínico-patológicos encontra-se sumarizados na Tabela 1.

Idade e sexo

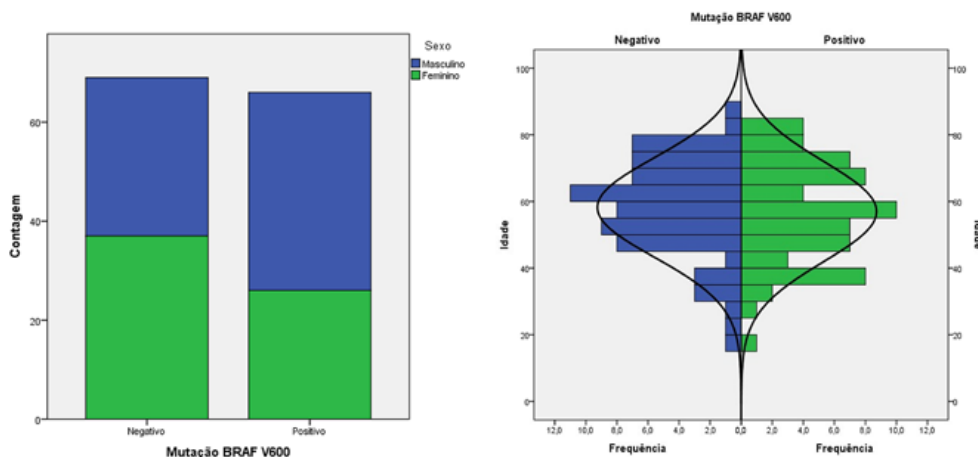
Não se identificam diferenças estatisticamente significativas nas características demográficas, sexo e idade (Tabela 1), das duas populações.

No sexo feminino a mutação foi menos frequentemente detetada do que no sexo masculino (39,4% vs 60,6%), *p* value de 0,98 (Fig. 1). No que respeita a idade, expressa no gráfico 2, a mutação BRAF foi mais frequentemente detetada no grupo com idade inferior a 50 anos (54,5% vs 43,7%), ainda que este resultado não tenha sido estatisticamente significativo.

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas do melanoma primário, de acordo com estado da mutação BRAF.

Variável	BRAF mutado (n=92)		BRAF não mutado (n=105)		p
	Nº de doentes	%	Nº de doentes	%	
Sexo					
Feminino	36	39,4	56	53,6	0,980
Masculino	56	60,6	49	46,4	
Idade à data de diagnóstico do melanoma primário, anos					
Média	58,3		57,0		
Amplitude	19,8-82,2		15,3-80,7		
Localização do melanoma primário					
Cabeça e pescoço	17	18,5	16	15,2	0,005
Tronco	48	52,3	27	25,8	
Membro superior	4	4,6	13	12,1	
Membro inferior	21	23,1	46	43,9	
Oculto	2	1,5	3	3	
Espessura (Breslow), mm					
0,01-1,0	7	7,7	3	3,3	0,250
1,01-2,0	20	21,2	17	16,4	
2,01-4,0	21	23,1	31	29,5	
>4,0	35	38,5	43	41,0	
Desconhecida	9	9,6	10	9,8	
Tipo histológico					
Extensão superficial	53	57,6	43	41,3	0,019
Nodular	33	35,6	33	31,7	
Lêntigo maligno	2	1,7	2	1,6	
Acral lentiginoso	0	0	20	19,0	
Desmoplásico	0	0	2	1,6	
Spitzóide	0	0	2	1,6	
Não classificável	4	5,1	3	3,2	
Índice mitótico					
Com mitoses	48	51,9	58	55,8	0,782
Sem mitoses	28	30,8	33	31,1	
Desconhecido	16	17,3	14	13,1	
Estadio AJCC à data do diagnóstico					
I	8	8,6	5	4,8	0,514
II	16	17,2	22	20,6	
III	59	63,8	73	69,8	
IV	9	10,3	5	4,8	
Localização da primeira metástase distante					
Nodal, cutânea, Tecidos moles	50	54,6	50	47,7	0,136
Pulmonar	25	26,6	38	35,8	
Visceral	17	18,8	17	16,5	
Metastização cerebral					
Ausente	66	71,4	66	62,9	0,205
Presente	26	28,6	39	37,1	

Artigo Original



Figuras 1 e 2 - Distribuição dos subgrupos BRAF mutado e BRAF não mutado no que respeita ao sexo e idade, respetivamente.

Estadio

No que respeita ao estadio à data do diagnóstico (Tabela 1), a mutação de BRAF foi detetada mais frequentemente no grupo de doentes em estadio IV, embora sem significância estatística.

Localização

No que respeita à localização anatómica (Fig. 3), os melanomas localizados na cabeça e pescoço bem como nos membros superiores, não existe uma diferença significativamente estatística. No entanto, os melanomas BRAF não mutados são significativamente mais frequentes nos membros inferiores (43,9% vs 23,1% $p=0,005$), enquanto os BRAF mutados são significativamente mais frequentes no tronco (52,3% vs 25,8% $p=0,005$).

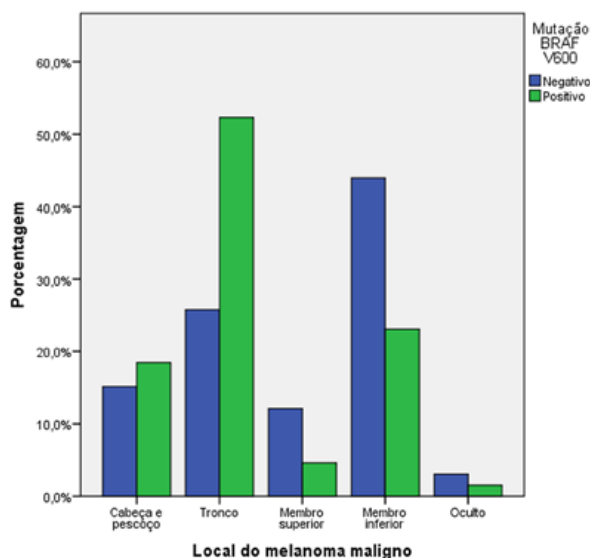


Figura 3 - Distribuição dos subgrupos BRAF mutado e BRAF não mutado no que respeita à localização anatómica.

Tipo histológico

Nos tipos histológicos mais frequentes (extensão superficial e nodular) não foi detetada variação relativamente à presença de mutação BRAF (Tabela 1). No tipo histológico acral lentiginoso todos os casos foram negativos para a mutação BRAF.

Espessura (Breslow), ulceração e número de mitoses

Relativamente à espessura tumoral - Breslow (Fig. 4), verificou-se que nos grupos de melanomas mais finos, a mutação BRAF estava mais frequentemente presente do que no grupo dos mais espessos (59,4% vs 40,6%), sem que tal diferença tenha tido significado estatístico ($p=0,25$).

No que respeita à presença de ulceração e ao número de mitoses por mm^2 (Figs. 5 e 6), não foi detetada relação com a presença de mutação BRAF ($p=0,951$).

Localização da primeira metástase

Na Fig. 7, observa-se que os doentes em que a metastização inicial foi pulmonar, uma percentagem menor de melanomas tinham a mutação, relativamente aos outros grupos (35,8% vs 26,6%). Esta diferença não foi estatisticamente significativa. De modo inverso, nos grupos em que a metastização inicial foi ganglionar, verificou-se uma percentagem superior de casos com mutação BRAF (39,1% vs 31,3%).

Metastização cerebral

Relativamente aos doentes com metastização cerebral documentada (Fig. 8), verificou-se que no subgrupo de doentes com metastização cerebral, a mutação BRAF estava menos frequentemente presente, sem que tal diferença tenha tido significado estatístico ($p=0,345$).

DISCUSSÃO

No nosso estudo, e em conformidade com os dados publicados na literatura,^{31,32} a mutação BRAF foi documentada

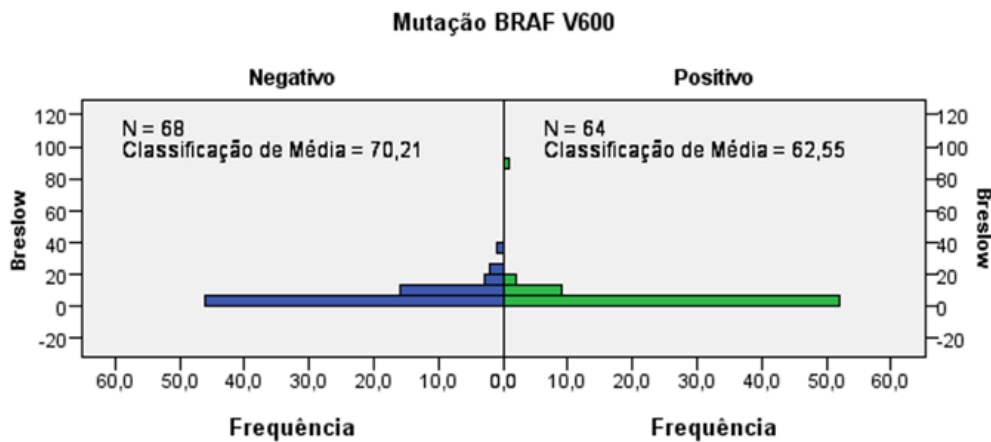
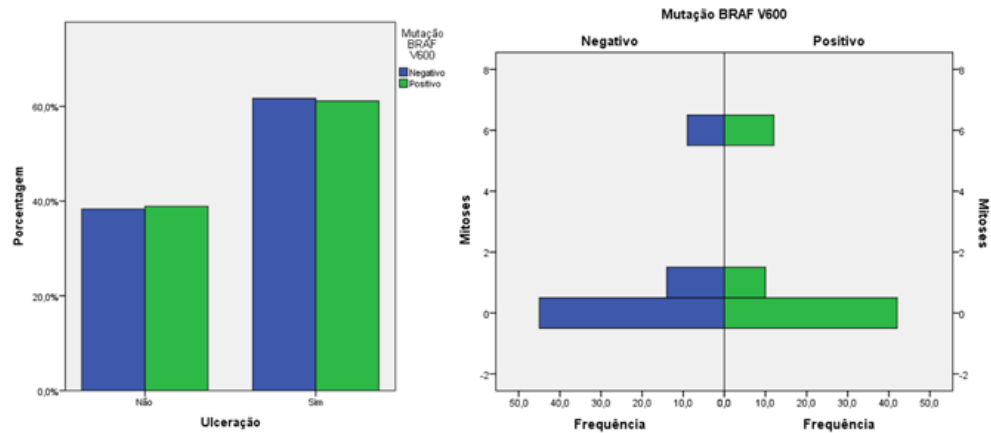


Figura 4 - Distribuição dos subgrupos BRAF mutado e BRAF não mutado no que respeita à espessura tumoral - Breslow.



Figuras 5 e 6 - Distribuição dos subgrupos BRAF mutado e BRAF não mutado no que respeita a presença de ulceração e ao número de mitoses, respetivamente.

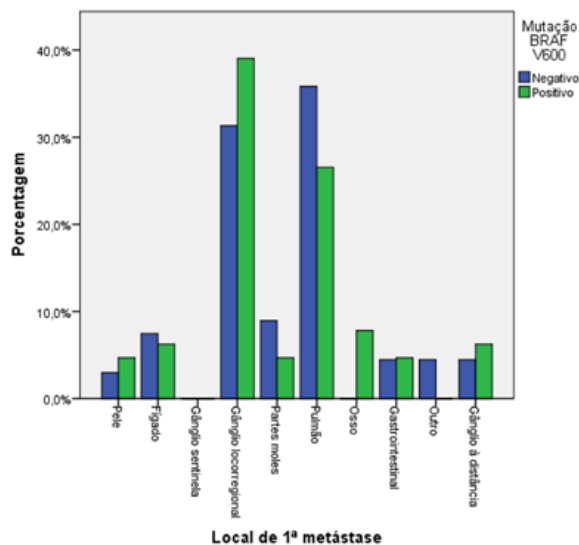


Figura 7 - Distribuição dos subgrupos BRAF mutado e BRAF não mutado no que respeita a localização da primeira metástase.

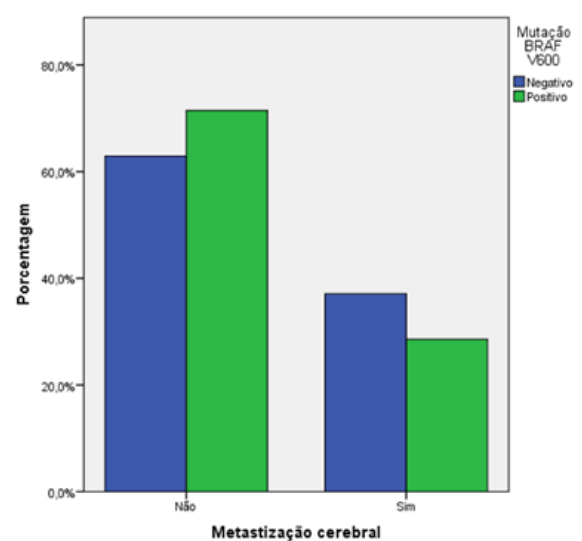


Figura 8 - Distribuição dos subgrupos BRAF mutado e BRAF não mutado no que respeita a metastização cerebral.

Artigo Original

em 46,7% (n=92) dos doentes, dos quais 60% (n=56) eram do género masculino. No que respeita à idade, não foi documentada uma diferença estatisticamente significativa na presença da mutação BRAF no subgrupo de doentes mais jovens, como descrito por outros autores.^{9,31}

Cinquenta e dois por cento (n=48) dos tumores primários estavam localizados no tronco, o que sugere a associação da mutação com a exposição solar intermitente, facto já bem documentado noutros estudos realizados, nomeadamente na metanálise publicada por Kim *et al.*³¹ No que concerne os critérios morfológicos de prognóstico, foi estudada a correlação entre o status BRAF dos tumores e a espessura tumoral (Breslow), ulceração e número de mitoses por mm². Nos grupos de melanomas mais finos, as mutações BRAF estavam presentes mais frequentemente do que no grupo dos melanomas mais espessos, embora sem significância estatística. No que respeita à presença de ulceração e ao número de mitoses, não foram detetadas variações relativamente à presença ou ausência de mutação BRAF. Estes dados vão de encontro às conclusões das metanálises publicadas, parecendo não existir uma correlação entre os critérios morfológicos supracitados e a presença da mutação BRAF.^{31,32}

É importante realçar que a população estudada incluiu apenas doentes em que foi realizada a pesquisa da mutação BRAF segundo critério clínico, ou seja, na sequência de evolução metastática da doença e para decisão da terapêutica futura. Esta limitação apresentada, presente numa vasta maioria dos estudos realizados e publicados até à data,³¹⁻³³ poderá explicar o número de melanomas com características clínico-patológicas desfavoráveis bem como a percentagem de doentes em estádios mais avançados, presentes neste estudo.

Em 40% dos doentes (n=79), a metastização ocorreu em múltiplos locais anatómicos e em 60% (n=118), a metastização única verificou-se nas cadeias ganglionares locorregionais e no pulmão. A metastização inicial pulmonar foi mais frequentemente associada a BRAF não mutado e a metastização inicial nas restantes vísceras à mutação BRAF. A mutação BRAF não foi encontrada no melanoma acral lentiginoso, embora o número de doentes da amostra apresentada com este subtipo histológico tenha sido limitada.

No presente estudo retrospectivo, que visou a avaliação da frequência da mutação num subgrupo de doentes provenientes do IPOLFG e a presença de eventuais correlações entre o status BRAF e os dados clínico-patológicos, não foram encontradas diferenças relativamente ao que está atualmente descrito na literatura.

É inequívoco que a busca pela compreensão dos mecanismos de sinalização molecular envolvidos na etiopatogénese do melanoma tem permitido o desenvolvimento de novos fármacos, com um impacto bastante significativo na sobrevida dos doentes. Contudo, e embora para conhecer o prognóstico e comportamento biológico do melanoma não seja suficiente saber o estado mutacional BRAF, é a primeira vez que um teste genético no melanoma permite dirigir uma terapêutica e ter vantagem na sobrevida global dos doentes.

Conflitos de interesse: Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

Fontes de financiamento: Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Confidencialidade dos dados: Os autores declaram ter seguido os protocolos da sua instituição acerca da publicação dos dados de doentes.

Protecção de pessoas e animais: Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Proveniência e revisão por pares: Não comissionado; revisão externa por pares.

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financing support: This work has not received any contribution, grant or scholarship.

Confidentiality of data: The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of data from patients.

Protection of human and animal subjects: The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the relevant clinical research ethics committee and with those of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Provenance and peer review: Not commissioned; externally peer reviewed

REFERÊNCIAS

1. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006;355:51-65.
2. Schadendorf D, van Akkooi AC, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, et al. Melanoma. *Lancet.* 2018;392:971-84. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31559-9.
3. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364:2507-16. doi: 10.1056/NEJMoa1103782.
4. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Dero AN, Panageas KS, et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1999;17:2745-51.
5. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 2000;18:158-66.
6. Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol.* 2004;22:1118-25.
7. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, 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.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-54.
 9. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2135-47.
 10. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The immune landscape of cancer. *Immunity*. 2018;48:812-830.e14. doi: 10.1016/j.immuni.2019.08.004.
 11. Hacker E, Hayward NK, Dumenil T, James MR, White-man DC. The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: Findings from an Australian population. *J Invest Dermatol*. 2010;130:241-8. doi: 10.1038/jid.2009.182.
 12. Houben R, Becker JC, Kappel A, Terheyden P, Bröcker EB, Goetz R, et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog*. 2004;3:6. doi: 10.1186/1477-3163-3-6.
 13. Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006;127:900-5.
 14. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 2008;5:e120. doi: 10.1371/journal.pmed.0050120.
 15. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Millikan RC, Groben PA, Hao H, et al. Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:991-7.
 16. 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:e46.
 17. Gorden A, Osman I, Gai W, He D, Huang W, Davidson A, et al. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res*. 2003;63:3955-7.
 18. Gallagher SJ, Thompson JF, Indsto J, Scurr LL, Lett M, Gao BF, et al. P16INK4a expression and absence of activated B-RAF are independent predictors of chemosensitivity in melanoma tumors. *Neoplasia*. 2008;10:1231-9.
 19. Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kempinen M, Pyrhönen S, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: A possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2003;9:3362-8.
 20. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L. Survival in BRAFV600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012;366:707-14.
 21. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicenter, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380:358-65. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X.
 22. Schadendorf D, Livingstone E, Zimmer L. Treatment in metastatic melanoma-time to re-think. *Ann Oncol*. 2019;30:501-3. doi: 10.1093/annonc/mdz050.
 23. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2017;377:1813-23. doi: 10.1056/NEJMoa1708539.
 24. McKean MA, Amaria RN. Multidisciplinary treatment strategies in high-risk resectable melanoma: Role of adjuvant and neoadjuvant therapy. *Cancer Treat Rev*. 2018;70:144-53. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.08.011.
 25. Hauschild A, Dummer R, Schadendorf D, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, et al. Longer follow-up confirms relapse-free survival benefit with adjuvant dabrafenib plus trametinib in patients with resected BRAF V600-mutant stage iii melanoma. *J Clin Oncol*. 2018;JCO1801219. doi: 10.1200/JCO.18.01219
 26. Kwak M, Farrow NE, Salama AK, Mosca PJ, Hanks BA, Slingluff CL, et al. Updates in adjuvant systemic therapy for melanoma. *J Surg Oncol*. 2019;119:222-31. doi: 10.1002/jso.25298.
 27. Liu JY, Lowe M. Neoadjuvant treatments for advanced resectable melanoma. *J Surg Oncol*. 2019;119:216-21. doi: 10.1002/jso.25352.
 28. Maio M, Lewis K, Demidov L, Mandalà M, Bondarenko I, Ascierto PA, et al. Adjuvant vemurafenib in resected, BRAFV600 mutation-positive melanoma (BRIM8): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:510-20. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30106-2.
 29. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandalà M, Liszky G, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:603-15. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30142-6.
 30. Saroufim M, Habib R, Karram S, Youssef Massad C, Taraf S, Loya A, et al. BRAF analysis on a spectrum of melanocytic neoplasms: an epidemiological study across differing UV regions. *Am J Dermatopathol*. 2014;36:68-73. doi: 10.1097/DAD.0b013e318293f355.
 31. 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;72:1036-46.e2. doi: 10.1016/j.jaad.2015.02.1113.
 32. Lee JH1, 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;164:776-84. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10185.x.
 33. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1753-7.