



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular

**“Bases moleculares del melanoma mucoso
nasosinusal.”**

TESIS DOCTORAL

RODRIGO CASANUEVA MURUÁIS

2024



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Bases moleculares del melanoma mucoso nasosinusal.	Inglés: Molecular basis of the sinonasal mucosal melanoma.

2.- Autor	
Nombre: Rodrigo Casanueva Muruáis	
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado.	

RESUMEN (en español)

Introducción: los melanomas mucosos nasosinuales (MMNS) son neoplasias agresivas que representan el 5% de los tumores malignos nasosinuales y que se asocian, en general a un mal pronóstico independientemente del estadio al diagnóstico y de la modalidad terapéutica empleada.

Hipótesis: el conocimiento del perfil de las alteraciones genéticas y moleculares podría ayudar a identificar a aquellos pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con terapias dirigidas.

Objetivos: describir los aspectos clínico-patológicos de nuestra muestra, analizar con tecnología de secuenciación de nueva generación la existencia de mutaciones accionables y tratar de establecer una posible correlación entre la presencia de dichas mutaciones y la supervivencia.

Material y métodos: se analizaron los datos clínicos de 26 pacientes con diagnóstico de MMNS, tratados en el departamento de otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, entre 1994 y 2022. Se realizó el estudio genético en 15 casos, no disponiendo de muestra suficiente o de calidad en los restantes. Se analizaron 10 de ellos a partir de muestras en fresco y 5 a partir de muestras parafinadas. Las 10 muestras en fresco se analizaron a través de un panel de genes y las mutaciones identificadas se confirmaron con secuenciación Sanger. En las 5 muestras parafinadas se realizó una secuenciación Sanger de los hotspots de los genes HRAS, NRAS y BRAF. Se realizó un análisis MLPA del gen NF1 en las 15 muestras y una secuenciación del exoma completo en 11 de ellas. Las 4 restantes no se analizaron porque la muestra se había consumido en los análisis previos.

Resultados: la muestra analizada presentó una edad media al diagnóstico de 74 años, con una distribución similar en cuanto a los sexos. La localización de las lesiones más frecuente fue la fosa nasal y en un 65% de los casos se presentó como enfermedad avanzada, con un 15% de metástasis ganglionares y menos del 5% de metástasis a distancia. El 92% de los pacientes fueron tratados con cirugía como primera modalidad terapéutica, el 63% de ellos mediante abordaje endoscópico, demostrándose una mejor supervivencia global (SG) frente a abordajes abiertos ($p=0,045$). La SG a los 3 años fue del 32%, con una supervivencia específica de enfermedad del 43% y una supervivencia libre de enfermedad del 23%. El análisis genético identificó mutaciones en genes implicados en la ruta MAPK en el 47% de las muestras y en la ruta PI3K-AKT-mTOR en el 27%, existiendo estas últimas en comutación con elementos de la ruta MAPK en el 75% de los casos. Se identificó una frecuencia de mutaciones inactivadoras en NF1 del 33%, con un 13% deleciones parciales. No se pudo demostrar que dichas mutaciones tuviesen un impacto en la supervivencia.

Discusión/Conclusiones: la serie analizada demostró ser representativa de la patología a estudio al compararla con series con un mayor número de pacientes. El abordaje endoscópico demostró, además de su beneficio cosmiético y en términos de calidad de vida, la no inferioridad (incluso superioridad en términos de SG) con respecto a abordajes abiertos. Se



identificó una incidencia de mutaciones en elementos críticos de la ruta MAPK del 47%, con un perfil mutacional diferenciado del melanoma cutáneo. El 33% de la muestra analizada albergaba mutaciones inactivadoras en NF1, identificándose en 2 pacientes deleciones intragénicas inactivadoras previamente no descritas y no identificables mediante las técnicas de secuenciación empleadas habitualmente. El 27% de los pacientes presentaban mutaciones en elementos críticos de la ruta PI3K-AKT-mTOR, con una alta tasa de comutación por lo que, en conjunto, el 53% de los pacientes analizados en nuestra serie, presentaban al menos una mutación que los convertía en potenciales candidatos a terapias dirigidas.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction: sinonasal mucosal melanoma (SNMM) is an aggressive neoplasm that accounts for 5% of sinonasal malignancies and is generally associated with a poor prognosis, regardless of the stage at diagnosis and therapeutic approach.

Hypothesis: understanding the profile of genetic and molecular alterations could help identify patients who could benefit from targeted therapies.

Objectives: to describe the clinical-pathological aspects of our sample, analyze the existence of actionable mutations by next-generation sequencing technology and attempt to establish a potential correlation between these mutations and survival.

Methods: clinical data from 26 patients diagnosed of SNMM and treated in the otorhinolaryngology department of the Hospital Universitario Central de Asturias, between 1994 and 2022 were analyzed. The genetic study was performed in 15 cases, due to insufficient or poor-quality samples in the remaining cases. 10 fresh tissue and 5 paraffin-embedded samples were analyzed. The fresh samples were subject to gen-panel analysis, confirmed by Sanger sequencing. In the five paraffin-embedded samples, Sanger sequencing targeting HRAS, NRAS and BRAF hotspots was conducted. MLPA analysis of the NF1 gene was performed on all 15 samples, and whole exome sequencing was performed on 11 of them. The remaining four samples were not analyzed due to sample depletion from previous analyses.

Results: the analyzed sample had an average age at diagnosis of 74 years, with a similar distribution between sexes. The most frequent location of the lesions was the nasal cavity, with 65% of cases presenting as advanced disease, 15% with lymph node metastasis and less than 5% with distant metastases. Surgery was the primary therapeutic modality for 92% of patients, of which 63% underwent endoscopic approaches, showing better overall survival (OS) compared to open approaches ($p=0,045$). Three-year OS was 32%, with 43% of disease-specific survival and 23% of disease-free survival.

Genetic analysis identified mutations in MAPK pathway genes in 47% of samples and in the PI3K-AKT-mTOR pathway in 27%, the latter co-occurring with MAPK pathway mutations in 75% of cases. Inactivating mutations in NF1 were found in 33% of samples, 13% due to partial deletions. These mutations could not be shown to have an impact on survival.

Discussion/ Conclusions: the analyzed sample was representative of the studied pathology in comparison with larger series. Endoscopic approaches, besides cosmetic and quality of life benefits, demonstrated non-inferiority (even superiority in terms of OS) compared to open approaches. The incidence of mutations in critical elements of the MAPK pathway was 47%, with a profile that differs from that of the cutaneous melanoma. Inactivating mutations in NF1 were present in 33% of cases, including previously undescribed intragenic inactivating deletions non detectable by conventional sequencing techniques. In addition, 27% of patients had mutations in critical elements of the PI3K-AKT-mTOR pathway, often co-occurring with mutations in the MAPK pathway. In total, 53% of our patients had at least one mutation that qualified them as potential candidates for targeted therapies.

*A mi madre,
Covadonga Muruáis González,
quien me enseñó todo lo que importa.*

Todo lo que soy es por y para tí.

AGRADECIMIENTOS

Con la conclusión de este proyecto necesito recapitular y destacar la importancia de un gran número de personas que me han guiado, acompañado y elevado para que hoy pueda estar aquí, firmando mi tesis doctoral.

Desde una perspectiva académica, mi *alma mater* investigadora y laboral siempre será el servicio de otorrinolaringología del HUCA. Durante los años de mi residencia me he visto moldeado por sus métodos pero sobre todo por la personalidad de sus componentes.

- A mis compañeros residentes, tanto mayores como pequeños, compañeros en los devenires de nuestra formación: Dani, Marta, Pauli, Sara, Jaime, Mario, Mamen, Juesas, Elena, Javi, Lulo y Camila. He aprendido de todos vosotros y disfrutado con vosotros de todos los buenos momentos que hemos podido encontrar. Entre todos me gustaría destacar a Dani quien es el autor primordial de la base de datos de melanomas, un referente y un guía; a Pauli, quien me llevó a conocer el laboratorio y siempre me ayudó a encontrar la mejor manera de afrontar los problemas; y a Mario, quien solía decirme lo que no quería pero necesitaba oír.
- A Eva Villanueva le reservo una mención independiente, aunque dejar por escrito todo lo que ha significado su apoyo, amistad y compañerismo estos años sería imposible.
- A mis adjuntos del HUCA: Cesar, Justo, Tino, Andrés, Rafa, Juan Pablo y Patri, quienes trataron de enseñarme lo mejor que pudieron y siempre fueron un ejemplo de excelencia. Necesito destacar a la Dra. María Costales por su confianza, por hacer lo correcto aunque no siempre fuera fácil y, en definitiva, por su amistad.
- A mi tutor de residencia, el Dr. Fernando López le agradezco su generosidad y su ejemplo. Junto con el Dr. Juan Pablo Rodrigo ha tenido que revisar mis trabajos en muchas ocasiones y para mí ha sido un honor trabajar con ellos.
- A mi jefe y tutor de Tesis, el Dr. José Luis Llorente, porque el tiempo que me has dedicado en esta tesis es una deuda impagable y por ser el ejemplo andante de una voluntad inquebrantable por ser siempre el mejor. Todas tus lecciones las he anotado, incluso las que no he sido capaz de entender todavía.
- A mi otro tutor de tesis, el Dr. Mario Hermsen, porque su alegría solo parece superable por su conocimiento y porque da sentido a la frase: “sin ti nada de esto hubiera sido posible”.

Siempre he sido más afortunado que listo y, si bien mi fortuna en cuanto a compañía académica es sobresaliente, la relativa a mi vida personal es insuperable.

- A mi familia, para los que mi único interés como médico está en mi capacidad para contarles historias: a mi tío Jaime, sin el cual seguiría estudiando biofísica de primero de medicina, que me enseñó que “hay que dejar que el lápiz escriba, que él sabe lo que tiene que escribir”; a mi tío Luis, que me dio los trucos psicológicos para superar los obstáculos del estudio; a mi abuelo Suso, que me dijo que me juntase con los listos y eso hice; a mi tía Susana, quien siempre fue una segunda madre; a mi primo Andrés, lo más parecido a un hermano pequeño; a mi prima Cecilia, el ser más sensato de mi familia y a mis primas Carlota y Patricia, que no saben de esta tesis pero seguro que “la aman”.
- A Pancho, por ser el ejemplo vivo de la bondad absoluta.
- A mis hermanas, Lara y Carla, por su amor incondicional aun cuando no me lo merezco. Nuestra relación de hermanos no está descrita en ningún libro de psicopatología, pero no la cambiaría por ninguna otra.
- A mi abuela Nené, que es a la vez la fuerza incontrolable y el obstáculo inamovible. Su fortaleza podría ser objeto de otra tesis.
- A Julio López, Ricardo López y Adrián González, porque son buena gente pero mejores amigos no hay. Siempre fuisteis los grandes damnificados del tiempo que tuve que dedicar al estudio y, aunque no siempre lo compartíais, siempre me apoyasteis en todo lo que hice. Que me queráis es mi mayor fuente de orgullo.
- A Alfonso Mandía y Martín Negreira, que no se conocen todavía, pero su papel en mi vida los pone en paralelo. Por siempre ser un ejemplo cercano y un estímulo que no me permite relajarme demasiado.
- A Gerardo Navarro, por ser siempre mucho más que un amigo pero un poco menos que una esposa y hacer, de un piso cochambroso en Madrid, un hogar.
- A mis amigos de Oviedo, especialmente a Borja, por expandir juntos nuestro horizonte de intereses y aficiones y a Luka, por lo que nos hemos divertido sufriendo juntos. Me habéis hecho mejor de lo que era.
- A Luis Baeza, con lo bueno y lo malo de un hermano, sin duda la persona que más problemas ha tenido que oír sobre esta tesis. A Clara González, porque siempre “es muy feliz” y se alegra por mí más que yo mismo.
- A Alicia Pérez Pérez, que me regaló una vida que creí que me era negada y, completándome, estropeó para siempre mi soledad. A través de tu mirada, juzgo mis acciones, para intentar estar a la altura de lo que piensas de mí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANATOMÍA NASOSINUSAL.....	2
1.2 CARCINOMAS NASOSINUSALES.....	4
1.3 MELANOMAS MUCOSOS NASOSINUSALES.....	4
1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	5
1.3.2 ETIOPATOGENIA.....	5
1.3.3 DIAGNÓSTICO.....	6
1.3.3.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	6
1.3.3.2 EXPLORACIÓN FÍSICA.....	6
1.3.3.3 ESTUDIOS DE IMAGEN.....	7
1.3.3.4 ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	8
1.3.3.5 BIOPSIA DE GANGLIO LINFÁTICO CENTINELA.....	9
1.3.3.6 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	10
1.3.3.7 PRESENTACIÓN ONCOLÓGICA.....	10
1.3.3.8 ESTADIFICACIÓN.....	11
1.3.4 ONCOLOGÍA MOLECULAR.....	12
1.3.4.1 RUTA DE LAS MAP-QUINASAS.....	12
1.3.4.2 RUTA PI3K-AKT-mTOR.....	13
1.3.4.3 NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1 Y GEN NF1.....	16
1.3.4.4 SUBTIPOS GENÓMICOS DE MELANOMA.....	19
1.3.4.4.1 SUBTIPO BRAF MUTADO.....	19
1.3.4.4.2 SUBTIPO RAS MUTADO.....	20
1.3.4.4.3 SUBTIPO NF1 MUTADO.....	20
1.3.4.4.4 SUBTIPO TRIPLE NEGATIVO.....	21
1.3.5 TRATAMIENTO.....	21
1.3.5.1 CIRUGÍA.....	21
1.3.5.2 RADIOTERAPIA.....	23
1.3.5.3 TERAPIAS SISTÉMICAS.....	24
1.3.5.3.1 TERAPIAS DIRIGIDAS.....	25
1.3.5.3.2 INMUNOTERAPIA.....	25
1.3.5.3.3 BIOQUIMIOTERAPIA.....	26
1.3.6 PRONÓSTICO.....	27
2. HIPÓTESIS.....	28

3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAL Y MÉTODOS	32
4.1 PACIENTES Y MUESTRAS	33
4.2 DATOS CLÍNICOS.....	34
4.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN	35
4.4 ANÁLISIS MUTACIONAL.....	36
4.4.1 NGS Y SECUENCIACIÓN DE <i>HOTSPOTS</i> POR PCR	36
4.4.2 MLPA	39
4.4.3 SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO	42
4.4.4 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	42
4.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	43
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
5. RESULTADOS	47
5.1 MUESTRA COMPLETA.....	48
5.1.1 DESCRIPCIÓN MUESTRAL	48
5.1.2 RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO	54
5.1.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	54
5.2 MUESTRA CON ESTUDIO GENÉTICO.....	58
5.2.1 DESCRIPCIÓN MUESTRAL	58
5.2.2 RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO	60
5.2.3 RESULTADOS DE LA SECUENCIACION.....	62
5.2.3.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO	62
5.2.3.2 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	78
6. DISCUSIÓN.....	84
6.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	85
6.2 ANÁLISIS CLÍNICO	86
6.3 ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR.....	97
6.3.1 RUTA DE LAS MAPK	97
6.3.2 RUTA PI3K-AKT-mTOR	103
6.3.3 OTROS GENES.....	104
6.4 PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS	105
6.4.1 TERAPIAS DIRIGIDAS.....	105
6.4.2 INMUNOTERAPIA	110
6.5 LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO	112
6.6 PERSPECTIVAS FUTURAS	114

7. CONCLUSIONES	116
8. BIBLIOGRAFÍA.....	119
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	144
9.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO 1: MODELOS DE REGRESIÓN DE COX	145
9.2 MATERIAL SUPLEMENTARIO 2: ANÁLISIS DE LAS CNV	148
9.3 MATERIAL SUPLEMENTARIO 3: ANÁLISIS MLPA.....	152
9.4 MATERIAL SUPLEMENTARIO 4: ANÁLISIS WES.....	184

ABREVIATURAS

En orden alfabético

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AKT: Proteína quinasa B.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- AJCC: *American Joint Committee on Cancer*.
- AMPc: Adenosina-monofosfato cíclico.
- cNO: Cuello con adenopatías clínicamente positivas.
- cN+: Cuello con adenopatías clínicamente negativas.
- CENS: Cirugía endoscópica nasosinusal.
- CNS: Carcinomas nasosinuales.
- CNV: Variantes de número de copias.
- CTLA-4: Antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos.
- EAI: Efectos adversos inmunomediados.
- EEUU: Estados Unidos de América.
- EMA: Agencia europea del medicamento.
- ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular-signal-regulated kinases*).
- FDA: *Food and Drug Administration*.
- GAP: Proteína aceleradora de la actividad GTPasa.
- GDP: Guanosina difosfato.
- GTP: Guanosina trifosfato.
- HR: *Hazard Ratio*.
- IHQ: Inmunohistoquímica.
- IMRT: Radioterapia de intensidad modulada.
- LCR: Tasa de control local (*local control rate*).
- LOH: Pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*).
- M: Categoría TNM relativa a las metástasis a distancia.
- MAPK: Proteínas quinasa asociadas a mitógeno (*mitogen-associated protein kinase*).
- MAP2K1: MAPK quinasa 1.
- MAP2K2: MAPK quinasa 2.
- MAPK1: Proteína quinasa asociada a mitógeno 1.
- MAPK3: Proteína quinasa asociada a mitógeno 3.
- MC: Melanoma cutáneo.

- MLPA: Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (*multiplex ligation-dependent probe amplification*).
- MM: Melanoma mucoso.
- MMAR: Melanoma mucoso ano-rectal.
- MMCC: Melanoma mucoso de cabeza y cuello.
- MMNS: Melanoma mucoso nasosinusal.
- mTOR: Diana de la rapamicina en los mamíferos.
- MMVV: Melanoma mucoso vulvo-vaginal.
- N: Categoría TNM relativa a las metástasis ganglionares regionales.
- NCCN: *National comprehensive cancer network*.
- NF1: Neurofibromatosis tipo 1.
- NGS: Secuenciación de nueva generación.
- PAAF: Punción-aspiración con aguja fina.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- PD-1: Proteína relacionada con la muerte celular programada 1.
- PET: Tomografía por emisión de positrones.
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.
- QRT: Químico-radioterapia.
- QT: Quimioterapia.
- R0: Resección microscópicamente negativa para malignidad.
- R1: Resección macroscópicamente negativa para malignidad.
- R2: Resección macroscópicamente positiva para malignidad.
- RM: Resonancia magnética.
- RT: Radioterapia.
- RT-PCR: PCR con transcripción inversa.
- SEE: Supervivencia específica de enfermedad.
- SG: Supervivencia global.
- SLE: Supervivencia libre de enfermedad.
- SLP: Supervivencia libre de progresión.
- T: Categoría TNM relativa al tumor primario.
- TC: Tomografía computarizada.
- TCGA: *The Cancer Genome Atlas Network*.
- TIL: Linfocitos infiltrantes tumorales.
- UV: Ultravioleta.
- VGF: Vaciamiento ganglionar funcional.
- VGS: Vaciamiento ganglionar selectivo.
- WES: Secuenciación de exoma completo (*whole exome sequencin*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMÍA NASOSINUSAL

La cavidad nasal está compuesta por dos fosas nasales que se extienden anteroposteriormente, desde la narina hasta la coana, separadas por el septum. Esta estructura la compone el cartílago cuadrangular anteriormente, y posteriormente el hueso vómer (inferiormente) y la lámina perpendicular del hueso etmoides (superiormente). Dicha porción del etmoides se continúa superiormente con su lámina cribosa, conformando la porción central del techo de la fosa nasal, que constituye el área olfatoria.

La pared lateral de cada fosa nasal tiene una estructura anatómica compleja pero de gran importancia clínica, con tres proyecciones bulbosas denominadas cornetes, que dividen las cavidades nasales en meato inferior, medio y superior, lugares de drenaje de los senos paranasales.

Los senos paranasales son un conjunto de cavidades neumáticas que rodean la fosa nasal, configuradas en tres grupos de cavidades pares, distribuidas una a cada lado de la línea media (senos maxilares, frontales y etmoidales) y una cavidad única, generalmente tabicada y localizada en la línea media: el seno esfenoidal.

Por su localización anatómica, los senos paranasales se encuentran en estrecha relación con estructuras vitales y neurovasculares, tanto del macizo facial como de la base del cráneo: el seno maxilar se relaciona de forma crítica con la órbita y su contenido superiormente, configurando el suelo de esta. De forma similar, el seno etmoidal constituye su pared medial y, el seno frontal, su techo; el seno etmoidal contribuye con el seno frontal para formar el suelo de la fosa craneal anterior; y el seno esfenoidal conforma la porción central de la base de cráneo, la pared posterior de la nasofaringe y la silla turca, y se encuentra, en función del grado de neumatización, en contacto directo con los nervios olfatorios, el quiasma óptico y la hipófisis, así como las arterias carótidas internas y el seno cavernoso^{1,2}.

Desde el punto de vista histológico, las fosas nasales están revestidas por epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, que se continúa en los senos paranasales y la nasofaringe¹, exceptuando el epitelio olfatorio y ciertas áreas de metaplasia escamosa en los cornetes inferior y medio, secundarias al trauma aerodinámico³.

El aporte vascular arterial de la fosa nasal y los senos paranasales procede de tres arterias principales: la arteria oftálmica, derivada de la arteria carótida interna, y las arterias maxilar interna y facial, derivadas de la arteria carótida externa. Su drenaje venoso sigue a los vasos arteriales y drena en la vena facial anteriormente, el plexo pterigomaxilar posteriormente y, superiormente, en las venas oftálmicas superiores y el seno sagital superior^{1,3}.

La inervación de la fosa nasal y los senos paranasales depende de una compleja red neural con diferentes funciones: sensitiva, autonómica y olfatoria. La inervación sensorial depende de las primeras dos ramas del nervio trigémino (V par craneal), la rama oftálmica y la rama maxilar. La inervación autónoma depende de los dos primeros segmentos torácicos (inervación simpática) y los núcleos salivares superior e inferior (inervación parasimpática), mientras que las fibras del nervio olfatorio (I par craneal) originadas en las células olfatorias, conforman el epitelio olfatorio¹.

El drenaje linfático de la porción anterior de la fosa nasal y el seno maxilar sigue a los canales vasculares y drena en los ganglios linfáticos submandibulares. La porción posterior de la fosa nasal y el resto de senos paranasales presentan un drenaje irregular a las cadenas ganglionares retrofaríngeas o bien directamente a la cadena linfática cervical profunda. Adicionalmente existen conexiones a través de los nervios olfatorios con los espacios subaracnoideo y subdural¹.

1.2 CARCINOMAS NASOSINUSALES

Los carcinomas nasosinuales (CNS) representan menos del 0,2% de todos los tumores malignos diagnosticados anualmente en el mundo y, aproximadamente, un 3,6% de todos los diagnosticados en el territorio de cabeza y cuello.

Los CNS tienen una incidencia aproximada de 1/100.000 habitantes, son más frecuentes en hombres y presentan cierta variabilidad geográfica, ostentando Asturias, la incidencia estandarizada por la edad más alta del mundo (1,7/100.000) junto con Tasmania y Guayana Francesa⁴.

Comprenden una amplia gama de subtipos histológicos, siendo el más frecuente el carcinoma de células escamosas queratinizante, seguido del adenocarcinoma (el subtipo más frecuente en Asturias, en concreto su variante intestinal⁵, el carcinoma de células cilíndricas (no queratinizante), el carcinoma indiferenciado, el linfoma, el melanoma y el esteseoneuroblastoma⁴.

El pronóstico de los pacientes con CNS es, en general, pobre y no ha cambiado sustancialmente en las últimas 3 décadas, con una supervivencia global (SG) a los 5 años del 55%, sin diferencias entre sexos y con mínimas diferencias entre los diferentes subtipos histológicos^{4,5}.

1.3 MELANOMAS MUCOSOS NASOSINUSALES

Los melanomas mucosos (MM) son un tipo de neoplasia infrecuente originada a partir de los melanocitos de cualquier membrana mucosa⁶, más frecuentemente a partir de aquellos localizados en la mucosa respiratoria del área de cabeza y cuello (MMCC), la mucosa gastrointestinal del área ano-rectal (MMAR) y la mucosa genitourinaria del área vulvo-vaginal (MMVV)⁷.

El melanoma mucoso nasosinusal (MMNS) se desarrolla a partir de la mucosa respiratoria que recubre la fosa nasal y los senos paranasales.

1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA

Con una incidencia estimada en los Estados Unidos de América (EEUU) de 0,05 casos por cada 100.000 habitantes⁸, el MMNS representa el 4-8% de todos los tumores malignos de la fosa nasal y senos paranasales⁸⁻¹², con una marcada predilección por la mucosa de la cavidad nasal (81%)¹³ frente a otras localizaciones.

El MMNS presenta una distribución similar entre sexos, con un ratio hombre:mujer de 1,3¹⁴⁻¹⁷ y una edad de debut entre la séptima y la octava década¹⁸⁻²⁰, en promedio 20 años más tarde que el melanoma cutáneo (MC)^{11,21}.

Coincidiendo con el descenso en la incidencia de la mayoría de CNS, se ha informado un llamativo incremento en la incidencia del MMNS^{19,22,23} en los países occidentales, así como de los MMCC en general²⁴.

1.3.2 ETIOPATOGENIA

El MMNS se origina a partir de los melanocitos de origen neuroectodérmico localizados en membranas mucosas que recubren la fosa nasal y los senos paranasales²², donde se les presupone una función inmunogénica^{25,26}.

La etiología y patogenia de los MM sigue siendo desconocida y, hasta la fecha, no existen factores de riesgo claramente relacionados con su desarrollo. Dada su localización, inicialmente se atribuyó a dichos melanocitos un papel en el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos, lo que motivó que los factores ambientales fueran propuestos como posibles agentes causales^{27,28}. Esto podría explicar el aumento de su incidencia, en paralelo con el incremento de las tasas de polución ambiental. Sin embargo, los resultados de estos estudios no han sido concluyentes²³.

1.3.3 DIAGNÓSTICO

1.3.3.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas del MM son en general inespecíficas, relacionadas con el órgano o sistema afecto y, rara vez, se acompañan de síntomas metabólicos²⁹. Las manifestaciones clínicas más frecuentes del MMNS son la obstrucción nasal y la epistaxis unilateral, manifestadas de forma conjunta en hasta el 95% de los pacientes. Otras manifestaciones frecuentes incluyen el dolor facial, la disosmia y el entumecimiento facial³⁰ mientras que la proptosis, la diplopía y los síntomas neurológicos corresponden generalmente a estadios tumorales avanzados³¹.

1.3.3.2 EXPLORACIÓN FÍSICA

La necesidad de establecer el diagnóstico diferencial con lesiones pigmentadas benignas y, sobre todo, con metástasis de otros melanomas primarios²⁹ hace fundamental que, el examen físico, se inicie con un examen dermatológico de cuerpo entero.

Los MMNS han demostrado manifestar especial predilección por la fosa nasal frente a los senos paranasales (20%)^{4,16,17} y, si bien la localización exacta de implantación del tumor primario es difícil de precisar en muchos casos¹⁷, la pared lateral de la fosa nasal y los cornetes inferiores son los emplazamientos más frecuentemente descritos (40% de los casos)⁴. En cuanto a los senos paranasales, el seno maxilar es el más frecuentemente afecto, seguido del etmoides y, en menor proporción, el seno frontal y el esfenoides^{16,32}.

Macroscópicamente, se presentan como lesiones carnosas, polipoideas y con una gran variabilidad en cuanto a su pigmentación^{30,33}, con un 30-70% de los casos descritos como amelanóticos⁸. En la mayor parte de los casos la afectación es unilateral

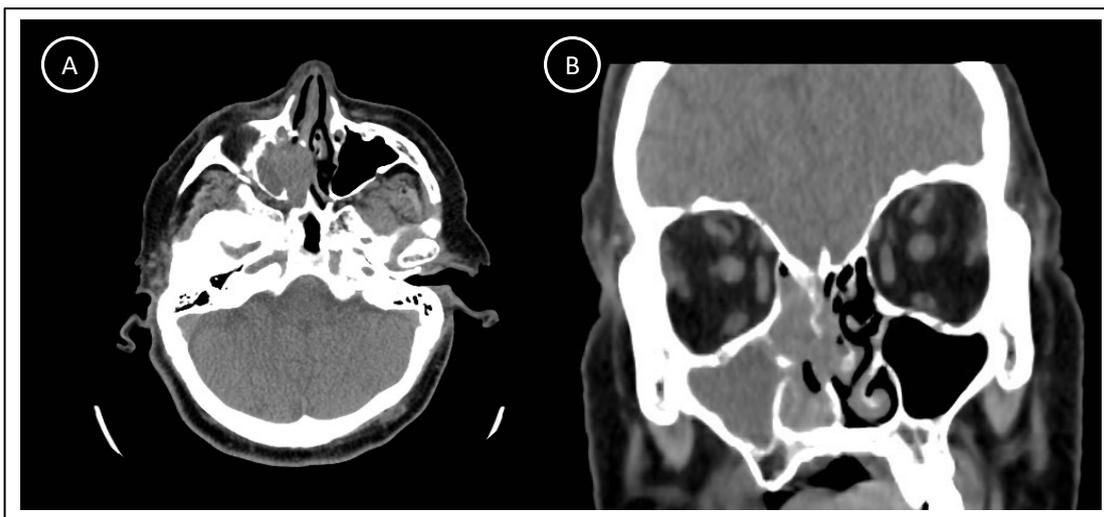
aunque con frecuencia se pueden apreciar lesiones satélite, incluso a centímetros del tumor primario y con extensión a través de los planos mucoso y submucoso^{15,34}.

1.3.3.3 ESTUDIOS DE IMAGEN

Está indicada la realización de un estudio de imagen transversal de la localización primaria del tumor, previo a la toma de biopsia con el fin de evitar artefactar dicho estudio. Tanto la tomografía computarizada (TC) (Figura 1) como la resonancia magnética (RM) son modalidades aceptadas para el estudio inicial del tumor primario³⁰, críticas en la determinación de su resecabilidad.

Figura 1

Imagen correspondiente a una TC de un paciente con un MMNS.



Nota. Disponemos tanto de un corte axial (A) como de uno coronal (B) en los que se aprecia una lesión expansiva en la fosa nasal derecha con destrucción de los cornetes y de la pared medial del seno maxilar derecho, así como una ocupación por material de densidad partes blandas del seno maxilar derecho y de las celdillas etmoidales ipsilaterales. Esta imagen corresponde a un paciente de nuestra serie.

Las diferentes secuencias de la RM proporcionan un patrón de información más preciso, tanto para la valoración de tejidos blandos como para la delimitación de la extensión tumoral en profundidad y la diferenciación entre tumor y moco, lo que la

convierte en el método diagnóstico de imagen de elección para muchos autores^{12,35,36}. La disponibilidad real de la RM continúa siendo inferior a la de la TC por lo que, en la práctica clínica, ciertos centros la reservan para casos concretos en los que precisan de una discriminación tisular más detallada. No obstante la tendencia en los centros de tercer nivel se dirige hacia la utilización de estas técnicas en combinación, con el fin de optimizar la estadificación y la planificación terapéutica.

La tomografía por emisión de positrones (PET) combinada con TC (PET-TC) o RM (PET-RM) está adquiriendo una importancia creciente en la estadificación inicial de la patología maligna de cabeza y cuello, permitiendo valorar tanto la localización primaria como las posibles metástasis regionales o a distancia. A pesar de que ha sido empleada ampliamente en investigación básica en MC, demostrando excelente correlación con los estudios anatomopatológicos, todavía existe poca evidencia acerca de su aplicación clínica en el MMCC^{12,37,38}.

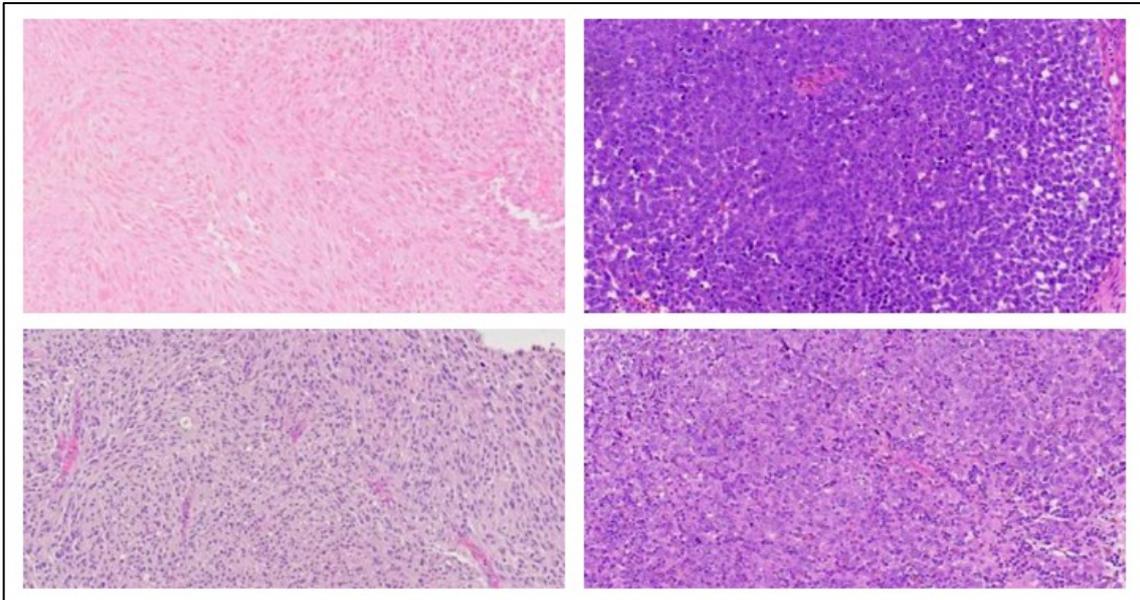
1.3.3.4 ANATOMÍA PATOLÓGICA

El examen histopatológico es el *gold standard* para el diagnóstico del MMNS. Dado que la histología es superponible a su equivalente cutáneo^{4,38,39}, es obligado el descartar la posibilidad de que nos encontremos ante una metástasis mucosa de un melanoma originado en otra localización anatómica, lo cual debe ser valorado por un patólogo experto y, generalmente, complementado con estudios de patología molecular.

La considerable variabilidad histológicas de los MM, como se muestra en la Figura 2, con frecuencia impone la necesidad de emplear técnicas complementarias al análisis anatomopatológico para un diagnóstico preciso.

Figura 2

Imágenes del análisis histológico de los casos 2, 7, 10 y 11 de nuestra serie.



Nota. Pese a que en todos los casos la tinción empleada ha sido la hematoxilina-eosina se hace evidente la gran variabilidad histológica observada.

En aquellos pacientes que presentan adenopatías clínicas, diagnosticadas tanto en la exploración como en las pruebas de imagen, sería recomendable contar con un diagnóstico anatomopatológico de confirmación. Este se realiza mediante una punción-aspiración con aguja fina (PAAF), recurriendo, de forma excepcional, a la biopsia escisional.

1.3.3.5 BIOPSIA DE GANGLIO LINFÁTICO CENTINELA

En el MM en general y en el MMNS en particular, a diferencia de otras enfermedades malignas, el valor clínico y pronóstico de la identificación de un ganglio linfático positivo para malignidad es incierto¹⁴. Esta ambigüedad asociada a la dificultad técnica intrínseca para la inyección del trazador en la localización del tumor primario y el coste asociado³⁰ hace que la indicación de la biopsia de ganglio linfático centinela para el MMNS sea cuestionable¹⁰.

1.3.3.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

La tinción inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica anatomopatológica complementaria, económica y no excesivamente complicada, empleada de forma general para evaluar la expresión de las proteínas asociadas a los tumores.

Cuando la concentración de pigmento melánico es escaso o ausente, el diagnóstico anatomopatológico del MMNS se dificulta, haciendo necesarias las técnicas IHQ, empleando un panel amplio de marcadores^{39,40}.

Los marcadores IHQ más empleados en el MMNS son S-100, HMB-45, Vimentina y Tirosinasa^{13,41,42}, y pese a existir referencias en cuanto al valor pronóstico de muchos de ellos, ninguno ha alcanzado dicha aplicabilidad en la práctica clínica.

Tanto Ki67 como pERK son marcadores IHQ que han sido estudiados para evaluar el estado de actividad de diferentes neoformaciones malignas. Ki67 es un marcador empleado de forma generalizada para la estimación la tasa de proliferación y progresión tumoral³⁹ cuyo valor pronóstico en el MMNS ha sido demostrado^{43,44}. Las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, procedente de *extracelular-signal-regulated kinases*) son proteínas se activan en respuesta a factores de crecimiento y mitógenos para inducir el crecimiento y diferenciación celular. pERK es el producto de expresión de la ruta de las proteínas quinasa asociadas a mitógeno (MAPK) y su sobreexpresión se asocia a gran número de neoplasias malignas humanas. Sin embargo en el caso de pERK, si bien su expresión ha sido descrita en el MMNS⁴⁵ no existen, por el momento, datos que respalden una implicación pronóstica.

1.3.3.7 PRESENTACIÓN ONCOLÓGICA

La localización oculta y poco expresiva, característica de esta enfermedad, favorece que a su diagnóstico se llegue, con frecuencia, en estadios avanzados²⁵.

Si bien la evolución de esta enfermedad está marcada por su tendencia a la diseminación hematogena por encima de la linfática¹⁴, el 60-80% de los pacientes con MMCC se presentan con la enfermedad confinada en su localización primaria^{46,47}. El 10-30% de estos pacientes se presentan con metástasis ganglionares regionales^{39,48} y el 10-15% presentan metástasis a distancia al diagnóstico^{17,39}.

1.3.3.8 ESTADIFICACIÓN

La búsqueda de un método de estadificación unitario y generalizado que permitiese una estimación pronóstica en el MMNS dio como resultado el ensayo de múltiples sistemas. Entre ellos destaca el propuesto por Ballantyne⁴⁹ en 1970, como extensión de la estadificación de los MC de cabeza y cuello, que se vería modificado en 2004 por Prasad et al.⁵⁰, quienes propusieron un sistema de estadificación basado en el nivel de invasión microscópica de la mucosa.

Sin embargo, actualmente, la clasificación imperante por haber demostrado correlacionarse de forma más estrecha con el pronóstico en numerosos estudios⁵¹⁻⁵³ es la propuesta por la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*⁵⁴, empleándose actualmente la 8ª edición.

Esta estadificación, dada la agresividad propia de esta enfermedad, no contempla la existencia de las categorías T1 o T2, es decir las relativas a la enfermedad localizada. Definirá como T3 a aquellos tumores limitados a la mucosa y a los tejidos subyacentes, independientemente del grosor o la extensión superficial mayor. Reserva la clasificación T4 para aquellos casos con enfermedad avanzada, distinguiendo entre T4a, que corresponde a enfermedad moderadamente avanzada en la que la extensión de la enfermedad afecta a tejidos profundos incluyendo hueso y cartílago o bien a la piel suprayacente; y T4b, que corresponde, por tanto, a enfermedad muy avanzada en la que el tumor afecta al cerebro, duramadre, base de cráneo, pares craneales bajos, espacio masticador, carotídeo, prevertebral o bien a estructuras mediastínicas. En lo relativo a las características de las metástasis ganglionares regionales, la categoría N0 corresponde a la ausencia confirmada de metástasis ganglionares y la categoría N1 a su

presencia; de forma paralela, en lo relativo a la categoría M, la categoría M0 representará la ausencia de metástasis a distancia frente a M1, que representará su presencia.

1.3.4 ONCOLOGÍA MOLECULAR

En todas sus localizaciones (tanto a nivel cutáneo como mucoso), la transformación maligna de los melanocitos se produce como consecuencia de la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y moleculares. Si bien, las rutas concretas que conducen al desarrollo de los MM son desconocidas, se conocen ciertas alteraciones en genes y rutas metabólicas implicadas¹⁴.

Las rutas de señalización estudiadas y que se pormenorizan a continuación, quedan representadas de forma esquemática y simplificada en la Figura 3.

1.3.4.1 RUTA DE LAS MAP-QUINASAS

La ruta MAPK es una ruta de señalización intracelular implicada en el crecimiento celular, la supervivencia y la invasión y, por tanto, promotora de la tumorigénesis. En los mamíferos, las MAPK se agrupan en tres familias principales⁵⁵:

- Las quinasas tipo ERK que se relacionan con el receptor de tirosina quinasa, los receptores asociados a proteínas G, las integrinas, así como RAS y RAP.
- Las quinasas Jun amino terminal: esta familia se activa en respuesta a factores de estrés ambiental tales como radiación ionizante, calor, estrés oxidativo y daños del ácido desoxirribonucleico (ADN), y juega un papel importante en la apoptosis e inflamación.
- Las quinasas activadas por estrés (p38/SAPK): esta familia también reacciona a estresores ambientales y citoquinas inflamatorias de forma que la activación de

p38 contribuye a la inflamación y apoptosis, así como a la diferenciación y regulación celular.

La ruta MAPK se activa a nivel de la membrana plasmática mediante la unión extracelular de un ligando con un receptor de superficie, que puede ser un receptor asociado a una proteína G o bien un receptor de tirosina-quinasa²⁵.

Esto conduce a la activación de las proteínas tipo RAS⁵⁶. Todas las proteínas RAS existen en dos configuraciones: la mayoría se encuentran en un estado inactivo en forma de RAS-GDP (guanosina difosfato) y una pequeña fracción en un estado metabólicamente activo con conformación RAS-GTP (guanosina trifosfato). Únicamente en esta conformación GTP, las proteínas RAS pueden regular la cascada de proteínas efectoras que forma la ruta RAS-RAF-MAPK⁵⁷. Esto genera la activación de RAF que a su vez fosforila y activa las MAPK quinasa 1 (MAP2K1) y 2 (MAP2K2).

En la vertiente ERK de la ruta, estas quinasas activas a su vez fosforilan y activan la MAP quinasa 3 (MAPK3 o ERK1) y la MAP quinasa 1 (MAPK1 o ERK2)^{56,58}.

Las proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (GAP) favorecen el paso de GTP a GDP. La conversión del RAS-GTP en RAS-GDP inactiva a RAS, previniendo la activación de la ruta.

1.3.4.2 RUTA PI3K-AKT-mTOR

La cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR es crítica para el crecimiento, desarrollo, diferenciación y supervivencia celular y comparte con la ruta de las MAPK la participación de los elementos críticos NRAS, KRAS y NF1.

Es considerada una de las rutas metabólicas más frecuentemente mutadas en los carcinomas de cabeza y cuello y todos sus elementos críticos se han identificado alterados en diferentes tipos de tumores malignos⁵⁹.

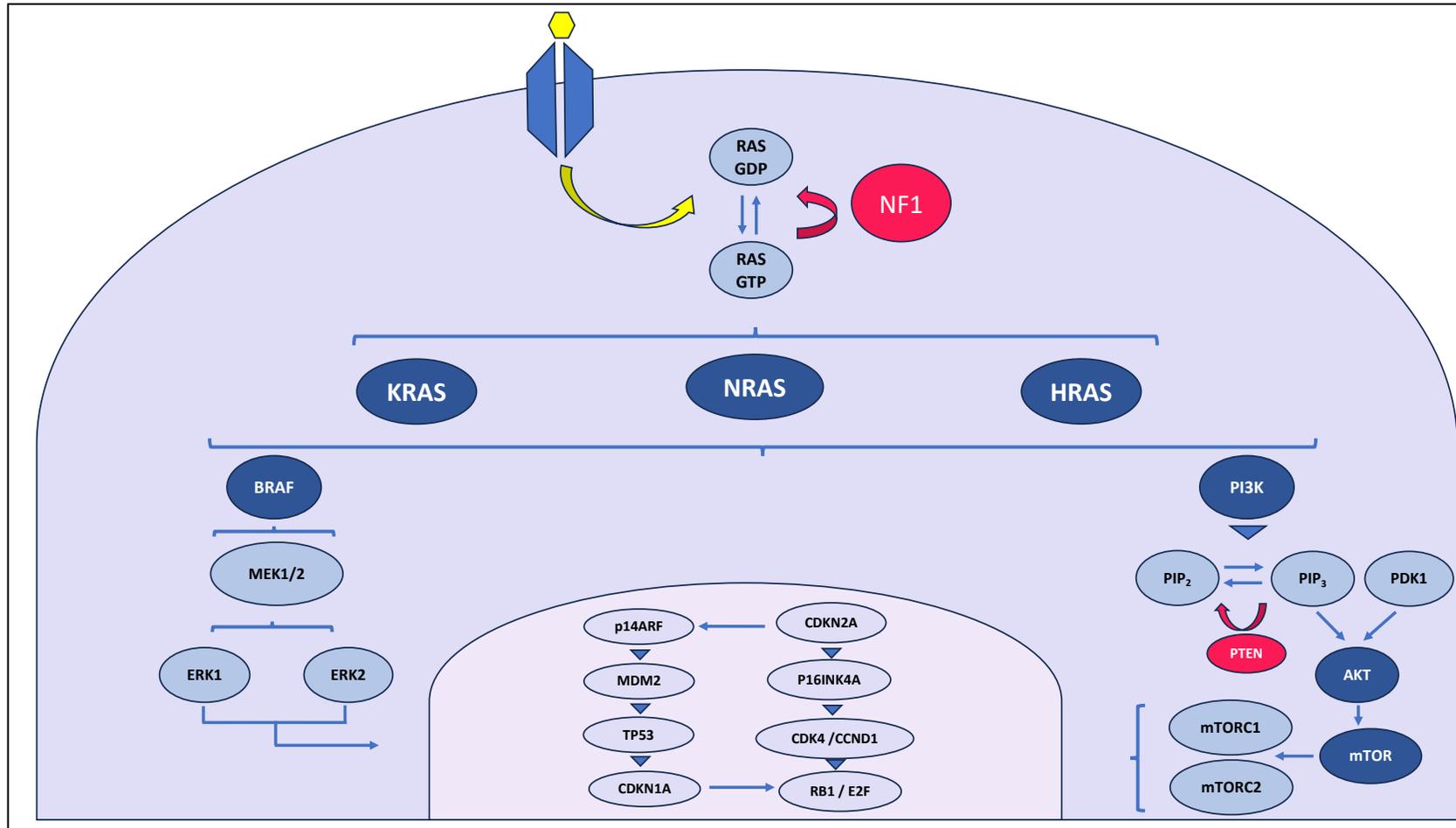
La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) es una quinasa que actúa fosforilando al intermediario PIP2 en PIP3, siendo este último el que, a través de PDK1 se encarga de fosforilar a la proteína quinasa B (AKT). Esta proteína, una vez fosforilada y convertida en pAKT libera a la diana de la rapamicina en los mamíferos (mTOR) de sus reguladores negativos TSC1 y TSC2, e inactiva a pRAS40 que es un regulador negativo de mTOR. Este complejo TSC1/2 se encuentra a su vez regulado por otras rutas como las de MAPK y LKB1-AMPK⁶⁰.

mTOR es una proteína reguladora de la síntesis proteica y la biogénesis de los ribosomas, promoviendo la tumorigénesis y constituye un punto de convergencia de múltiples señales de crecimiento y proliferación celular.

PTEN es el segundo gen supresor de tumores más frecuentemente mutado en los carcinomas humanos, con una frecuencia global de mutaciones somáticas en los carcinomas de cabeza y cuello del 2-3%⁶¹. Este gen actúa como regulador negativo de PI3K defosforilando PIP3 en PIP2, de forma que su pérdida de función conduce a la acumulación del producto PIP3 que, por tanto, activa la cascada de señalización.

Figura 3

Ruta de señalización de las MAPK y la ruta PI3K-AKT-mTOR.



Nota. Figura propia.

1.3.4.3 NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1 Y GEN NF1

La neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es una condición genética relativamente común, con una incidencia de 1 de cada 2.000-5.000 nacidos vivos a nivel mundial⁵⁷. Se trata de un trastorno genético con herencia autosómica dominante, causado por una mutación que ocasiona una pérdida de función en el gen neurofibromina 1, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q11.2)⁶² y se caracteriza porque, aproximadamente un tercio de los casos, se desarrollan *de novo* a través de mutaciones esporádicas en el gen NF1⁵⁸.

Esta enfermedad tiene una penetrancia del 100% pero una expresividad variable, incluso entre miembros de la misma familia con mutaciones idénticas⁶³ por lo que, en general, no existe una correlación entre una alteración concreta del gen y un fenotipo particular, exceptuando 3 situaciones específicas: la delección completa del gen NF1, que se asocia a una forma severa de la enfermedad; la delección de 3 pares de bases en el exón 17 (c.2970-2972 del AAT), que se asocia a las características alteraciones pigmentarias de NF1 sin neurofibromas cutáneos o de superficie; y la duplicación del gen que genera discapacidad intelectual y epilepsia sin otras características. Esta variabilidad tanto interfamiliar como intrafamiliar resalta la influencia de factores tanto epigenéticos (secuencias codificantes de proteínas, micro ácido ribonucleico (ARN), regiones de ARN no codificantes) como ambientales y hormonales^{58,63} en la expresividad de esta enfermedad.

El gen NF1 es considerado un gen supresor de tumores clásico, precisando la inactivación de ambas copias del gen para el desarrollo de tumores. Esto se conoce como la hipótesis del *doble hit* o de Knudson: el primer evento es heredado o adquirido en forma de mutación germinal, mientras que el segundo procede de un evento somático. La pérdida de heterocigosidad debida a reordenamientos somáticos, deleciones o recombinaciones puede alterar el alelo NF1 nativo, lo que potencialmente puede afectar a otros genes del cromosoma 17 como son: el gen supresor de tumores p53 (17p13.2) el factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2) (17q21.1), la

topoisomerasa 2 alfa (17q21.1), la señal transductora y activadora de la transcripción 3 (STAT3) (17q21.2) y el gen del cáncer de mama tipo 1 (BRCA1) (17q21.2)⁵⁷.

El gen NF1 se transcribe en un ARN mensajero (ARNm) que codifica para la proteína multidominio neurofibromina, compuesta por 2818 aminoácidos y expresada de forma ubicua en el organismo^{58,63}.

Su función supresora de tumores es atribuida a una región central compuesta por 360 aminoácidos codificados por los exones 20-27, que presenta una marcada similitud estructural y de secuencia con las GAP⁵⁷, actuando como regulador negativo de la ruta MAPK al facilitar la conversión de la forma activa RAS-GTP en la inactiva RAS-GDP^{56,58}. Como forma de soporte de esta función crítica GTPasa de RAS, ciertas mutaciones *missense* de NF1, suprimen selectivamente esta función sin afectar a la estructura de la proteína⁵⁸. Las mutaciones inactivadoras en NF1 conducirán, por tanto, a la activación constitutiva de la ruta MAPK, tanto en dirección a ERK como a PI3K-AKT-mTOR, eventos frecuentes en numerosos tumores malignos⁶⁴.

La neurofibromina puede ejercer su función supresora de tumores, de forma independiente de su función GAP⁶³:

- Como regulador positivo de la enzima adenilato ciclasa actúa regulando la actividad RAS. Los niveles elevados de adenosina-monofosfato cíclico (AMPc) activan Rap1 que es un antagonista de la vía RAS. No obstante la regulación de la vía MAPK por medio del AMPc varía en función de los tejidos y no se ha demostrado claramente su función fuera del sistema nervioso central.
- La disminución de sus niveles ha demostrado activar la ruta Rho-ROCK-LIMK2-Cofilina que conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina, promoviendo la movilidad celular, adhesión e invasión.
- Las quinasas de adhesión focal también interactúan con la neurofibromina regulando adhesión, proliferación, motilidad y supervivencia celular.

El gen NF1 es uno de los genes más largos del genoma humano, compuesto por 58 exones distribuidos por un gran locus de 350 kilobases de ADN genómico, incluyendo 4 exones ensamblados de forma alternante. Se caracteriza por una tasa mutacional en línea germinal 10 veces superior a la observada para la mayoría de las enfermedades genéticas, con una muy alta proporción de casos esporádicos atribuidos a mutaciones *de novo*⁶⁵.

El espectro mutacional de gen NF1 ha sido caracterizado de forma exhaustiva por múltiples autores^{62,65-68} y está compuesto por un 27% de mutaciones de cambio o pérdida de sentido (*missense/nonsense*), 16% de mutaciones de empalme (*splicing*), un 27% de microdeleciones, 11% microinserciones, un 2% inserciones-deleciones, 13% deleciones grandes (>20 pares de bases), 2% inserciones grandes (>20 pares de bases) y un 0,6% de reordenamientos complejos⁵⁷.

Un gran desafío, para los médicos y genetistas que trabajan con este gen, es la identificación y caracterización exitosa de las mutaciones causales en su paciente. El problema radica en ciertas características del gen, incluyendo su gran tamaño (350.000 pares de bases) y complejidad (58 exones), la ausencia de *hotspots* o mutaciones recurrentes y el amplio espectro de mutaciones observadas, lo que obliga a un análisis del gen completo para identificar potenciales mutaciones patogénicas⁵⁷. De forma adicional, a las más de 1.200 mutaciones de la línea germinal diferentes publicadas por *The Human Gene Mutation Database*, ha de añadirse la presencia de posibles pseudogenes, que pueden dificultar más el diagnóstico molecular. En base a ello es necesario un protocolo multifase que incluya análisis de ADN genómico y ARNm mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), PCR con transcripción inversa (RT-PCR), secuenciación directa, MLPA (amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples), marcaje de microsatélites y FISH (hibridación fluorescente *in situ*)⁶³.

Las mutaciones en los genes de una ruta concreta tienden a exhibir un comportamiento mutuamente excluyente debido a que, en general, una sola mutación es suficiente para alterar una ruta de tal forma que otros daños en la misma ruta no confieran una ventaja selectiva. Los tumores esporádicos asociados a mutaciones en

NF1, por tanto, tenderían a presentar un comportamiento mutuamente excluyente con mutaciones en la ruta de las MAPK. Sin embargo, se ha demostrado una capacidad de las mutaciones de NF1 de actuar tanto de forma cooperativa como exclusiva con BRAF y NRAS⁵⁷.

1.3.4.4 SUBTIPOS GENÓMICOS DE MELANOMA

En el MC, la ruta MAPK se encuentra activada en más del 90% de los casos por mutaciones en sus componentes clave: BRAF, NRAS y NF1. Si bien la incidencia de dichas mutaciones activadoras se ha identificado en menor proporción en los MM (28%)²⁵, estas son potenciales candidatas a terapias dirigidas, lo que suscita un gran interés en entender su papel en la tumorigénesis del MMNS.

El estudio dirigido por Akbani para el TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) en 2015⁶⁹ se propuso una clasificación genómica para el MC definiendo cuatro subtipos, cada uno definido por la presencia de mutaciones en uno de sus componentes clave (BRAF, RAS y NF1), y estableciendo un cuarto subtipo denominado triple-negativo (*triple-wildtype*) para definir a aquellos que carecían de mutaciones en dichos genes. Sin embargo, por el momento, la aplicabilidad clínica de esta clasificación molecular para el MM en general, y el MMNS en particular, no está completamente caracterizada ni aceptada.

1.3.4.4.1 SUBTIPO BRAF MUTADO

Es el subtipo genómico más frecuente, en el que se incluyen más del 50% de los MC^{56,69}. Más del 85% de las mutaciones en BRAF se localizan en el locus V600⁶⁹ y la mayoría tienen capacidad para promover la conformación activa de BRAF y potenciar la ruta en dirección a MEK independientemente de RAS⁶⁴.

Esta firma mutacional es típica de los melanomas localizados en áreas expuestas a radiación ultravioleta (UV), lo que hace que esta incidencia no se traduzca de forma similar en el MM, donde es próxima al 10%^{14,25,29,70,71}.

Las mutaciones de BRAF, en términos generales, se definen como mutuamente excluyentes con las mutaciones en RAS^{64,72} y en KIT. Sin embargo, en su estudio, Akbani et al.⁶⁹ demostraron que las mutaciones en BRAF no localizadas en *hotspots* sí tienden a correlacionarse con la presencia de mutaciones accionables en RAS y NF1.

1.3.4.4.2 SUBTIPO RAS MUTADO

El segundo subtipo más frecuente es el definido por la presencia de mutaciones activables en los tres miembros principales de la familia RAS (N-, K- y H-RAS), descritos en un 28% de pacientes con MC⁶⁹.

Estas mutaciones en RAS (principalmente NRAS) se han identificado en entre un 10%^{25,73,74} y un 20%^{29,45} de los casos de MM, una frecuencia discretamente inferior a la identificada en MC⁶⁹. En el MMNS se han descrito con una incidencia algo superior, con una frecuencia mutacional del 14%^{42,45,75-77} al 30%¹⁸.

Si bien estas mutaciones tienden a comportarse de forma mutuamente excluyente con las identificadas en BRAF⁶⁹, numerosos estudios en MMNS han negado esta naturaleza de forma estricta^{4,76}.

1.3.4.4.3 SUBTIPO NF1 MUTADO

Constituye el tercer subtipo molecular más frecuente de MC, comprendiendo aproximadamente el 12-18% de todos los melanomas, particularmente aquellos asociados a daño solar crónico, pacientes mayores, melanomas con mayor carga mutacional o aquellos con BRAF y NRAS nativos⁵⁸.

Estas mutaciones fueron identificadas en el trabajo de Akbani et al.⁶⁹ para el TCGA en un 14% de los MC, cerca del 50% de las cuales implicaban a una pérdida de función y por tanto una activación de la ruta MAPK. El estudio desarrollado por Cosgarea et al.⁷⁸ en MM demostró una incidencia ligeramente superior de mutaciones en este gen (18%) de las cuales hasta el 70% demostraron ser inactivadoras.

1.3.4.4 SUBTIPO TRIPLE NEGATIVO

Este subtipo corresponde a aquellos tumores que no manifiestan mutaciones en BRAF, RAS ni NF1 pero que suelen presentar múltiples mutaciones en otras vías de señalización. Este subtipo comprendió el 14% de los MC en el estudio de Akbani et al.⁶⁹ caracterizados por un patrón diferencial de mutaciones con respecto al resto de subtipos.

Recientemente se ha descrito una mayor incidencia en este grupo de genes de fusión, infrecuentes en el melanoma, pero que pueden comportarse como mutaciones conductoras o *driver*⁷⁹.

1.3.5 TRATAMIENTO

El desarrollo y establecimiento de guías de práctica clínica para el manejo del MM ha sido un verdadero desafío, debido principalmente a lo infrecuente de la patología, lo que condiciona que ningún centro posea, de forma independiente, una cantidad suficiente de pacientes para realizar un ensayo clínico aleatorizado que proporcione comparaciones de calidad entre las diversas modalidades de tratamiento.

Esto motiva que, las asunciones relativas a su historia natural y su manejo, provengan de datos retrospectivos, procedentes de series pequeñas, acumuladas durante largos periodos de tiempo y manejadas con regímenes de tratamiento inconstantes.

1.3.5.1 CIRUGÍA

Independientemente del subtipo y la localización, el tratamiento que ha demostrado proporcionar las mejores opciones de supervivencia y curación a largo plazo es la cirugía, lo que hace que continúe siendo la intervención terapéutica primaria para el manejo del MM y MMCC en general^{24,30} y el MMNS en particular^{20,80}.

Históricamente, el manejo quirúrgico de estos tumores implicaba procedimientos radicales, basados en el principio oncológico de la resección *en-bloq* para tratar de obtener márgenes quirúrgicos microscópicamente sanos (R0).

Desde su concepción, a mediados del siglo XX, hasta su perfeccionamiento durante las décadas de 1970 y 1980, el abordaje craneofacial se convirtió en el estándar de cuidado para los tumores con afectación de la base de cráneo anterior con un impacto demostrado en la supervivencia. Como alternativa, la rinotomía lateral asociada a maxilectomía medial posibilita el lograr resecciones radicales, especialmente cuando la pared nasal lateral y el seno maxilar se encuentran afectados⁸¹.

Sin embargo, las particularidades anatómicas de las fosas nasales (un marco delimitado por los senos paranasales, la proximidad anatómica con estructuras vitales y la tendencia a la invasión de la órbita así como la duramadre) imposibilitan el lograr resecciones *en-bloq* con márgenes de seguridad en una gran proporción de pacientes, incluso mediante dichos abordajes^{82,83}.

El desarrollo de las técnicas mínimamente invasivas y su popularización permitió demostrar que la cirugía endoscópica nasosinusal (CENS) es un método efectivo para el tratamiento de los MMNS⁸⁴ asociada a una menor morbilidad funcional y cosmética. Asimismo, pese a violar frontalmente el principio de la resección *en-bloq* en favor de la resección tipo *piecemeal*^{85,86}, numerosos autores han demostraron buenos resultados y no-inferioridad para alcanzar resecciones R0 con respecto a los abordajes abiertos⁸⁷⁻⁹⁰, e incluso en algunas series mejores tasas de supervivencia y control local^{91,92}.

El manejo adecuado de los ganglios linfáticos regionales continúa siendo materia de debate cuando se analiza el tratamiento del MM. A diferencia del MC, en el que el estadio de los ganglios linfáticos es un factor pronóstico fundamental, su impacto en el MM es menos aparente. Consecuentemente no existe un estándar de tratamiento generalmente aceptado^{14,39}.

Hasta la fecha, no existe evidencia suficiente de que el tratamiento quirúrgico del cuello en el MMCC confiera una ventaja en términos de SG ni supervivencia libre de enfermedad (SLE) en ningún contexto, ni en cuellos sin evidencia de enfermedad ganglionar clínica (cN0) ni en aquellos que sí la presentan (cN+), por lo que según las guías británicas no se recomienda de rutina³⁰ y la tendencia actual es a un manejo individualizado.

1.3.5.2 RADIOTERAPIA

Pese a que históricamente, el MM ha sido considerado un tumor radorresistente, la heterogeneidad intratumoral e intertumoral demostrada, ha conducido a que la radioterapia (RT) haya encontrado su lugar en el algoritmo terapéutico de estos tumores¹⁵. Sin embargo, en la región nasosinusal, su papel aún es poco claro.

La RT puede desempeñar 3 papeles diferenciados en el tratamiento del MM: como tratamiento radical en aquellos pacientes no candidatos a cirugía; como tratamiento adyuvante para mejorar el control local; y como tratamiento paliativo para el control sintomático. Concretamente dentro del algoritmo terapéutico del MMNS la RT juega un papel similar, pero con particularidades:

- RT radical: se considera que, pese a que puede alcanzar cierto grado de control local, no es suficiente para controlar la enfermedad en su totalidad⁹³, sobre todo teniendo en cuenta su naturaleza sistémica⁹⁴ y en el metaanálisis publicado en 2015 por Li et al.⁹³ el tratamiento radical con RT se asoció, de igual manera que no recibir tratamiento, a un incremento del riesgo de muerte.
- RT adyuvante: en general, la mayor parte de los estudios coinciden en la indicación de la RT adyuvante cuando existe enfermedad extracapsular, dos o más adenopatías, adenopatías mayores de 3 cm, márgenes quirúrgicos positivos o próximos, enfermedad residual o recurrencia tras tratamiento quirúrgico^{11,24,95-98} con dosis y regímenes no consolidados⁹⁹⁻¹⁰¹.

Pese a que numerosos estudios han logrado demostrar una mejora significativa de la tasa de control local (LCR) con la RT adyuvante^{98,102}, esto no se ha traducido como se esperaba en mejoras en la SG ni supervivencia específica de enfermedad (SEE) de una forma consistente^{17,21,103,104}.

- RT paliativa: existe una completa falta de datos publicados sobre el uso de RT para tratar recurrencias locales o metástasis a distancia en el MM. No obstante es posible recomendar la RT paliativa de forma individualizada como recomendación tipo R de rescate, extrapolándolo de su aplicación en las mismas circunstancias en el MC¹⁵.

Las nuevas técnicas de radiación como la RT de intensidad modulada (IMRT), la arcoterapia volumétrica de intensidad modulada (VMAT), la tomoterapia y la terapia de transferencia lineal de energía (LET) con iones carbón, neutrones y protones, permiten obtener una isodosis superior y gradientes de dosis nítidos cerca de los volúmenes objetivo, disminuyendo la toxicidad inducida por RT y aumentando la eficiencia terapéutica^{96,105}.

En general, para el tratamiento RT en el MMNS, tanto la técnica como los valores óptimos en cuanto a dosis o a fraccionamiento no han sido adecuadamente definidos y varían en función de los estudios, con resultados equívocos^{101,106,107}. La IMRT está considerada el *gold standard* de RT para el tratamiento de MMNS¹⁰⁸, tanto de forma adyuvante como radical.

1.3.5.3 TERAPIAS SISTÉMICAS

El hecho de que más del 40% de los pacientes con MMNS desarrollen metástasis a distancia en su evolución, implica que la limitación del tratamiento local para mejorar la supervivencia no se puede corregir aumentando la intensidad del mismo¹⁰⁹, habiendo autores que sugieren incluso que el propio traumatismo tumoral secundario a dicho tratamiento local podría ser responsable de la liberación a la circulación de células tumorales y estar implicado en la enfermedad a distancia¹¹⁰. Bajo esta premisa, surge la

necesidad de incorporar una terapia sistémica efectiva para los pacientes con tumores avanzados y/o incurables.

1.3.5.3.1 TERAPIAS DIRIGIDAS

Dado que, independientemente del estado de los márgenes postquirúrgicos y el tratamiento adyuvante aplicado, la tasa de recurrencia local del MM se encuentra entre un 50-90% y la SG no varía, la necesidad de una caracterización molecular para identificar las mutaciones *driver* que constituyan dianas terapéuticas accionables, es imperiosa para alcanzar mejores resultados^{25,111}.

La ruta de las MAPK puede ser farmacológicamente inhibida con terapias dirigidas contra BRAF (vemurafenib, dabrafenib y encorafenib) y MEK (trametinib, binimetinib y cobimetinib), con moléculas aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) de EEUU. La inhibición dual mediante la combinación de inhibidores de BRAF y MEK ya ha sido aprobada para el tratamiento del MC^{69,112-114}. Asimismo, ensayos clínicos con tumores con mutaciones en KIT, como los tumores del estroma gastrointestinal o el MC, han demostrado que los pacientes con mutaciones en los exones 11 o 13 de este gen presenta mejor respuesta a la terapia dirigida contra el mismo (imatinib, nilotinib, desatinib o sorafenib), con resultados prometedores en los ensayos con MM metastásico.

Los inhibidores de mTOR, pese a haber demostrado resultados prometedores en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias malignas humanas, no tiene un uso aprobado, por el momento, para el tratamiento del melanoma.

1.3.5.3.2 INMUNOTERAPIA

A pesar de su diferente biología, los MM se tratan, en líneas generales, de la misma forma que el MC. Sin embargo, en la mayor parte de los ensayos clínicos recientes, los pacientes con MM son excluidos de forma sistemática, lo que genera una necesaria falta de datos y de evidencia¹⁵.

Los anticuerpos inmunomoduladores que afectan directamente a la función de los linfocitos T han alcanzado resultados prometedores en muchos tipos de tumores malignos, especialmente en el MC. Su denominación como inhibidores del *check point* proviene de su acción, bloqueando negativamente dianas implicadas en la inmunidad celular tipo T, principalmente el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína relacionada con la muerte celular programada 1 (PD-1). Existen 3 inhibidores del *check point* actualmente aprobados para el tratamiento del MC metastásico, bien dirigidos contra CTLA-4, el ipilimumab; o bien dirigidos contra PD-1, que son el nivolumab y el pembrolizumab²⁵.

Mientras que estudios previos no reflejaban mejoras en la supervivencia de los pacientes con MMNS con la inmunoterapia^{12,19}, la evidencia creciente defiende un beneficio independiente de otros tratamientos administrados^{24,115} reclamando para la inmunoterapia un papel más protagónico en el algoritmo terapéutico.

1.3.5.3.3 BIOQUIMIOTERAPIA

La combinación de agentes citotóxicos quimioterapéuticos con agentes biológicos inmunomoduladores (principalmente interferón o interleucina 2) constituye la base de la bioquimioterapia. La quimioterapia (QT) puede ser considerada una opción de tratamiento para aquellos pacientes en los que la inmunoterapia o la terapia dirigida no sea una opción, como en casos de enfermedades autoinmunes, tumores que carezcan de mutaciones *driver* o en aquellos casos en los que dichas terapias ya se hayan agotado³⁰.

Sin embargo, no existen para el MMNS terapias sistémicas con una eficacia clara, habiéndose testado numerosas combinaciones de agentes sin lograr demostrar beneficios en la supervivencia¹¹⁶⁻¹¹⁸.

1.3.6 PRONÓSTICO

Los MM son neoplasias agresivas que, fruto de su localización particular en la proximidad de las redes vasculares y linfáticas, tienden a la extensión regional y a distancia precoz. Es por ello por lo que se asocian, en general, a un mal pronóstico, independiente del estadio al diagnóstico¹¹⁹.

El MMNS mantiene el mal pronóstico de sus equivalentes en otras localizaciones de la anatomía corporal, con una SG estimada del 40% a los 5 años^{11,13,21,120,121}. Esta baja supervivencia se ve favorecida, en estos tumores, por el retraso diagnóstico asociado a su escasa visibilidad y la naturaleza asintomática de sus estadios iniciales.

En cuanto al fracaso terapéutico, la tasa de recurrencia local en MMCC es ligeramente superior al 50%¹⁷, cercana al 52% en el MMNS, con una tasa de recurrencia regional del 31%. Cerca del 25% de los pacientes presentan metástasis a distancia al diagnóstico¹⁷ y un 40% las desarrollaran durante el seguimiento^{82,122}.

Los factores relacionados con el tumor que se han asociado con un peor pronóstico en el MMNS son el estadio clínico y la invasión linfovascular o perineural, considerados factores predictores independientes de un deterioro de la SG^{11,95,99,123}. El aumento del tamaño del tumor¹²⁴⁻¹²⁶, la ulceración^{29,127}, la multifocalidad y la ausencia de pigmentación melánica^{102,128,129} constituyen otros factores macroscópicos que se han asociado de forma independiente con un peor pronóstico.

En lo relativo a la localización del tumor primario, los MMNS, y dentro de ellos los originados en los senos paranasales, comprenden los tumores de peor pronóstico dentro de los MMCC^{24,124,130-132}.

El sexo masculino y la edad avanzada han sido identificados también como factores no modificables de mal pronóstico, asociados de forma independiente con una peor SG^{6,133,134}.

2. HIPÓTESIS

El MMNS mantiene el mal pronóstico que caracteriza tanto a los MM como a los CNS en general, independientemente de los avances diagnósticos y en las diferentes modalidades terapéuticas.

La baja incidencia de estos tumores hace el que el conocimiento del que disponemos con respecto a esta patología sea de baja calidad, procedentes de estudios retrospectivos realizados sobre series pequeñas. Esto, unido al conocimiento de su naturaleza diferencial con respecto al MC, hace que hayan sido sistemáticamente excluidos de los ensayos clínicos y, por tanto, no se hayan beneficiado de las terapias dirigidas que tan importante impacto han tenido en el tratamiento del su equivalente cutáneo.

Una profundización en el conocimiento de los aspectos clínicos y patológicos y su relación con la supervivencia, unido al esclarecimiento del perfil de sus alteraciones genéticas y moleculares permitiría identificar a aquellos pacientes que podrían beneficiarse del empleo de terapias dirigidas.

3. OBJETIVOS

1. Describir los aspectos clínico-patológicos más relevantes de nuestra muestra de MMNS.
2. Identificar la existencia o no de factores de riesgo y pronósticos implicados en la supervivencia de dichos pacientes.
3. Estudiar mediante la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) la existencia de mutaciones accionables en la muestra de MMNS y, más concretamente en las rutas MAPK y mTOR.
4. Determinar mediante IHQ la posibilidad de predecir el estatus mutacional de la vía en base a la expresión de los efectores de las rutas MAPK y mTOR así como su impacto en el pronóstico.
5. Relacionar las alteraciones genéticas identificadas con las variables clínico-patológicas, especialmente con el pronóstico y la supervivencia de los pacientes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 PACIENTES Y MUESTRAS

Se incluyeron en este estudio los datos de 26 pacientes con diagnóstico confirmado de MMNS, tratados en el departamento de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España) entre 1994 y 2022.

Los criterios de inclusión empleados fueron el diagnóstico anatomopatológico confirmado de MM primario localizado en la fosa nasal y senos paranasales, excluyendo todos aquellos pacientes con antecedentes personales de melanomas primarios en otras localizaciones de la economía corporal, considerando que impediría descartar con certeza que se tratase de una metástasis mucosa de un MC.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación, con el número de aprobación 07/16 para el proyecto CICPF16008HERM.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para obtención, análisis y almacenamiento del material biológico.

En todos los casos se obtuvieron muestras para estudio anatomopatológico y biobanco. Las muestras tumorales fueron recopiladas de los archivos del biobanco del Hospital Universitario Central de Asturias.

Tras el procesamiento, se comprobó que únicamente 10 muestras en fresco eran aptas para el análisis oncológico-molecular. En 8 casos, también se obtuvieron muestras de sangre periférica permitiendo un estudio en paralelo del ADN tumoral y germinal. Se añadieron, en un segundo tiempo, 5 muestras procedentes de piezas tumorales incluidas en parafina, en las que la calidad de conservación tisular fue suficiente para el análisis, con el fin de ampliar la muestra y confirmar los hallazgos.

4.2 DATOS CLÍNICOS

Los datos clínicos de los 26 casos fueron recogidos de forma retrospectiva de la historia clínica hospitalaria.

Se incluyeron las variables demográficas relativas a la edad y sexo de los pacientes, así como su país de origen.

En cuanto a los antecedentes, se recogieron los principales antecedentes personales médico-quirúrgicos, así como los hábitos de consumo y/o exposición laboral a tóxicos.

En lo relativo al diagnóstico clínico, se estudiaron tanto el síntoma principal que motivó la consulta como las principales manifestaciones clínicas referidas por los pacientes.

En todos los casos se realizó una exploración nasofibroscópica sin sedación en consulta con toma de muestra para biopsia. En dicha exploración se obtuvieron datos subjetivos de la localización, la lateralidad, la extensión y la pigmentación. El diagnóstico se complementó con una técnica de imagen seccional que fue, en todos los casos de nuestra muestra, una TC. En determinados casos, en los que se sospechó la afectación orbitaria o de la base del cráneo, se complementó el diagnóstico con una RM. En aquellos en los que se sospechó la existencia de enfermedad a distancia la prueba complementaria empleada fue un PET-TC.

En todos los casos se obtuvo un diagnóstico anatomopatológico de confirmación y un análisis IHQ que incluyó los marcadores: Vimentina, S-100, HMB-45 y Melan-A.

Se realizó un seguimiento periódico de todos los pacientes hasta su fallecimiento. Se perdió el seguimiento de 3 pacientes que decidieron completar el tratamiento en su lugar de origen. Durante este seguimiento se valoró, clasificó y

cuantificó el fracaso del tratamiento, considerando como tal tanto la persistencia tumoral como la recidiva, ya fuera a nivel local, regional y/o a distancia.

En el punto final del seguimiento establecido para la realización del estudio, los pacientes fueron clasificados en base de su estado en cuatro categorías: vivo, muerto por tumor, muerto por otras causas y desconocido.

La supervivencia se valoró en base a tres mediciones: SLE, entendida como el tiempo desde la intervención hasta la recidiva local, regional o a distancia; la SG, entendida como el tiempo desde la intervención al fallecimiento del paciente; y la SEE, entendida como el tiempo desde la intervención hasta el fallecimiento, pero únicamente en aquellos pacientes fallecidos por la patología de estudio. Las tres mediciones fueron calculadas en meses.

4.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

En 10 casos, el ADN tumoral se extrajo de muestras de tejidos frescos congelados empleando el *Qiagen Tissue Extraction Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). En 8 de esos casos, pudo analizarse de forma conjunta con ADN germinal procedente de muestras de sangre periférica, procesándolo mediante el kit de preparación de plantillas de PCR de alta pureza (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), siguiendo las guías del proveedor.

En 5 casos adicionales, el ADN tumoral fue extraído de muestras de tejidos incluidas en parafina, mediante el *QIAmp ADN Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) empleando el protocolo de deparafinización y lisis publicado previamente por López et al.¹³⁵.

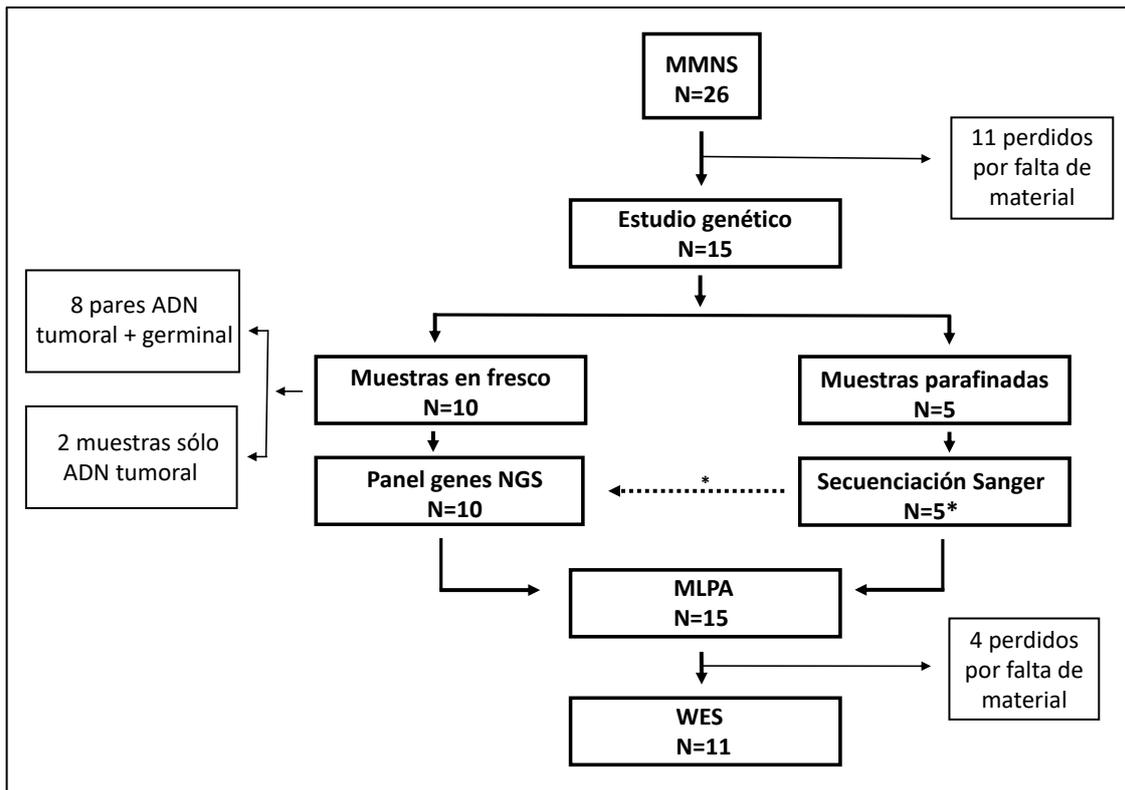
Todas las muestras de ADN aisladas se cuantificaron por fluorimetría, usando el kit *Qubit ds ADN HS* y por espectrofotometría (*NanoDrop*). Se empleó el índice Q/N (concentración Qubit / concentración *NanoDrop*) como control de calidad del ADN, debiendo ser mayor de 0,29.

4.4 ANÁLISIS MUTACIONAL

En la Figura 4 se representa de forma gráfica y simplificada la metodología y proceso del análisis mutacional.

Figura 4

Protocolo de análisis genético.



Nota. Los elementos de la figura marcados con (*) representan que, si bien la secuenciación Sanger se empleó inicialmente en las muestras parafinadas, también se utilizó para validar las mutaciones en NF1 encontradas mediante el panel de genes de NGS.

4.4.1 NGS Y SECUENCIACIÓN DE *HOTSPOTS* POR PCR

En los 10 casos inicialmente analizados a partir de muestras en fresco se obtuvieron los datos de secuenciación, tanto de ADN del tumor como de la línea germinal correspondiente en 8 casos, y únicamente del ADN tumoral en los 2 casos restantes.

En las muestras procedentes de estos 10 casos (casos 1-10) se realizó análisis mediante panel de genes, utilizando el *SureSelect QXT Target Enrichment Kit for Illumina Multiplexed Sequencing* (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EEUU) por el método descrito previamente por Sánchez-Fernández et al.¹³⁶. Se seleccionaron los genes que conformaron el panel en base al criterio de que su mutación fuese diana directa de un fármaco aprobado por la FDA o por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), que su mutación pudiese ser diana directa o indirecta de un fármaco en investigación en ensayos clínicos o preclínicos para el tratamiento del cáncer y/o que su mutación pudiese predecir la sensibilidad o resistencia a fármacos específicos aprobados, bajo investigación o en estudios preclínicos para el tratamiento del cáncer.

En base a dichos criterios, y tras una exhaustiva revisión de la literatura, se diseñaron las sondas para cubrir todos los exones de los siguientes 120 genes relacionados con tumores malignos: AKT1, AKT2, AKT3, ALK, APC, AR, ARAF, ATM, ATR, AURKA, BAP1, BCL2L1, BCR-ABL1, BCR-JAK2, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD4, CBL, CCND1, CCNE1, CDK4, CDK6, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, COL1A1-PDGFRB, CRLF2, CSF1R, CSF3R, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, EGFR, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC1, ERS1, ETV4, EWSR1, EZH2, FBW7, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOXA1, FOXL2, FOXP1, GNA11, GNAQ, HGF, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1, IGF1R, IGF2, IL10, IL7R, INPP4B, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MCL1, MDM2, MET, MGMT, MITF, MLL, MPL, MTOR, MYCC, MYCN, MYD88, NF1, NF2, NFKB1, NFKB2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NPM1, NRAS, NTRK1, PALB2, PDGFRA, PIK3CA, RET-PTC1, PIK3R1, PIK3R2, PML-RARA, PTCH1, PTEN, RAC1, RAF1, RB1, RET, RET-PTC1, ROS1, SH2B3, SMO, SOCS1, STAG2, STK11, TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-ETV1, TSC1, TSC2.

Las bibliotecas fueron secuenciadas en un sistema MiSeq (Illumina Inc.) en el servicio de secuenciación del Instituto de Medicina Oncológica y Molecular de Asturias (Oviedo, España) en grupos de 16-plex. La cobertura de la secuenciación fue de entre 212 y 420X.

Todas las mutaciones identificadas mediante esta NGS fueron confirmadas ulteriormente mediante secuenciación Sanger.

En los 5 casos adicionales procedentes de muestras parafinadas (casos 11-15), se realizó una secuenciación Sanger de los *hotspots* de los genes HRAS, NRAS y BRAF. La amplificación se desarrolló en un Termociclador Simpliamp VXA24811 en condiciones estándar y empleando los siguientes *primers*:

- KRAS exon 2 Forward: TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG / Reverse: CTGTATCAAAGAATGGTCCTG,
- KRAS exon 3 Forward: TGCACTGTAATAATCCAGACTGTG / Reverse: CTCCTTAATGTCAGCTTATTATATTCA,
- NRAS exon 2 Forward: GATGTGGCTCGCCAATTAAC / Reverse: CCGACAAGTGAGAGACAGGA,
- NRAS exon 3 Forward: GGCAGAAATGGGCTTGAATA / Reverse: TCGCCTGTCTCATGTATTG,
- HRAS exon 2 Forward: TGGCTGAGCAGGGCCCTCT / Reverse: CTGCTGGCACCTGGACGGCGGC,
- HRAS exon 3 Forward: AGAGGCTGGCTGTGTGAACT / Reverse: TGGTGTGTTGATGGCAAAC,
- BRAF exon 11 Forward: TCCCTCTCAGGCATAAGGTAA / Reverse: CGAACAGTGAATATTTTCCTTTGAT,
- BRAF exon 15 Forward: CTCATAATGCTTGCTCTGATAGG / Reverse: GCATCTCAGGGCCAAAAT,
- NF1 exon 2 Forward: TGTGGTTGATGCAGTTTTCC / Reverse: GTGAGGCCGCTTATAACCAA,
- NF1 exon 36 Forward: TCAAACTGGTCAAATCAATGG / Reverse: CAAGGTGGCAGCAGGTAGTT,
- NF1 exon 37 Forward: TCCTAGGGCAATCAGTCTTTC / Reverse: CCTACCGTAAACTCGGGTCA,
- NF1 intron 49 Forward: TGTCAGCATTTGGTGAGTACC / Reverse: GTGTTGGCCTGAGAAGGTTG.

Las condiciones de la PCR fueron 5min/95°C + 32 ciclos (30" 95°C /45" 58°C / 1min 72°C) + 7min/72°C + 4°C. Los productos de la PCR fueron purificados mediante la mezcla *Exo-BAP Mix* (EURx Ltd, Gdansk, Polonia) de acuerdo con las especificaciones del

fabricante, y analizadas mediante secuenciación Sanger empleando el *ABI PRISM 3100* y *3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City CA).

4.4.2 MLPA

Se realizó una MLPA del gen NF1 (inicialmente en las muestras parafinadas, pero aplicándose finalmente a toda la muestra en base a los resultados) de la forma recogida previamente por García-Inclán et al.¹³⁷.

Se emplearon las mezclas probemix P081-D1 NF1 mix 1 (a la que denominaremos MLPA NF1-1) y P082-C2 NF1 mix 2 (a la que denominaremos MPLA NF1-2) (MRC-Holland, Ámsterdam, Países Bajos) que de forma conjunta contiene sondas para los 58 exones de NF1 así como una sonda *upstream* (8.000 bases anterior al exón 1) y otra *downstream* (5.000 bases después del exón 58). Esta mezcla permite la detección de alteraciones en el número de copias de los exones específicos de NF1.

Los ratios de ADN tumoral frente a ADN normal menores de 0,75 en dos o más sondas consecutivas fueron interpretados como deleciones, mientras que los ratios mayores de 1,25 en 2 o más sondas consecutivas fueron interpretados como ganancias.

Los locus del gen NF1 analizados en los dos ensayos MLPA empleados se detallan en la Tabla 1:

Tabla 1: Resumen de los locos del gen NF1 estudiados en los dos ensayos MLPA.							
ENSAYO MLPA 1 (NF1-1)				ENSAYO MLPA 2 (NF1-2)			
N.º	Tamaño	Gen	Nombre	N.º	Tamaño	Gen	Nombre
2	136	NF1 - D	<i>Downstream</i> 18363-L23328	2	138	NF1 EX 01	EX1 18382-L19008
12	196	NF1 - U	<i>Upstream</i> 18368-L23333	15	227	NF1 EX 01	EX1 19362-L26201
3	142	NF1 EX 01	EX1 02491-L29974	5	160	NF1 EX 03	EX3 02494-L01925
6	160	NF1 EX 02	EX2 02493-L01924	7	172	NF1 EX 05	EX5 18173-L22738
9	178	NF1 EX 04	EX4 02865-L02617	12	205	NF1 EX 08	EX8 02498-L22716
13	202	NF1 EX 06	EX6 02497-L03706	42	463	NF1 EX 09	EX9 18037-SP0602-L22403
16	220	NF1 EX 07	EX7 18032-L22398	16	233	NF1 EX 10	EX10 02500-L26202
18	232	NF1 EX 11	EX11 13221-L26128	19	257	NF1 EX 12	EX12 03778-L26198
27	298	NF1 EX 13	EX13 02503-L22647	23	292	NF1 EX 14	EX14 02504-L26817
29	312	NF1 EX 15	EX15 04076-L22649	22	281	NF1 EX 15	EX15 19364-SP0809-L25738
34	353	NF1 EX 17	EX17 02507-L22658	26	317	NF1 EX 16	EX16 18369-SP0646-L23334
42	427	NF1 EX 18	EX18 12024-L26426	38	427	NF1 EX 19	EX19 12025-L23157
20	244	NF1 EX 21	EX21 21185-L29794	28	337	NF1 EX 20	EX20 18370-L23335
37	382	NF1 EX 21	EX21 21186-L29799	39	436	NF1 EX 22	EX22 18036-L22765
32	337	NF1 EX 23	EX23 21000-L29222	31	362	NF1 EX 25	EX25 18174-SP0619-L22739
41	418	NF1 EX 23	EX23 18408-SP0653-L23405	36	409	NF1 EX 27	EX27 18170-L26175
22	256	NF1 EX 24	EX24 18033-SP0601-L29798	3	147	NF1 EX 30	EX30 02512-L01943
21	250	NF1 EX 26	EX26 03849-L18072	43	472	NF1 EX 31	EX31 18038-L26174
4	148	NF1 EX 28	EX28 18364-L23329	34	391	NF1 EX 33	EX33 18365-L23330
39	400	NF1 EX 29	EX29 04072-L03709	6	166	NF1 EX 34	EX34 02514-L01945
7	166	NF1 EX 32	EX32 02513-L01944	11	197	NF1 EX 36	EX36 18374-L26502
10	184	NF1 EX 35	EX35 18367-L23332	40	444	OMG INT 36	IN36 NF1 04069-L03311
45	454	OMG INT 36	Intrón 36 NF1 04075-L03310	13	211	NF1 EX 38	EX38 02518-L01949
15	214	NF1 EX 37	EX37 02517-L26127	17	241	NF1 EX 40	EX40 02520-L26200
19	238	NF1 EX 39	EX39 02519-L01950	37	419	NF1 EX 43	EX43 03854-L23156

Continuación de la Tabla 1.							
ENSAYO MLPA 1 (NF1-1)				ENSAYO MLPA 2 (NF1-2)			
N.º	Tamaño	Gen	Nombre	N.º	Tamaño	Gen	Nombre
24	272	NF1 EX 41	EX41 02521-L22646	18	249	NF1 EX 44	EX44 12021-L26199
43	436	NF1 EX 42	EX42 03853-L29796	41	454	NF1 EX 45	EX45 03856-L03307
26	289	NF1 EX 47	EX47 04071-L01954	20	265	NF1 EX 46	EX46 02522-L01953
30	319	NF1 EX 49	EX49 02525-L22650	24	300	NF1 EX 48	EX48 02524-L22720
33	346	NF1 EX 50	EX50 02526-L01957	27	328	NF1 EX 51	EX51 13217-L22725
17	226	NF1 EX 51	EX51 19363-L25737	4	154	NF1 EX 53	EX53 12018-L12866
36	373	NF1 EX 52	EX52 02528-L01959	25	307	NF1 EX 54	EX54 18034-L22721
5	154	NF1 EX 57	EX57 05220-L03309	29	345	NF1 EX 55	EX55 02529-L01960
14	208	NF1 EX 58	EX58 19361-L26126	33	382	NF1 EX 56	EX56 18035-L22401
38	391	NF1 EX 58	EX58 02530-L01961	10	190	NF1 IN 01	IN1 12019-L12867
1	130	Ref.	00797-I00463 5q31	1	130	Ref.	00797-I00463 5q31
8	172	Ref.	09940-L29795 8q13	8	178	Ref.	11571-L12318 16q21
11	190	Ref.	09836-L10246 11q24	9	184	Ref.	17862-L22121 19q13
23	264	Ref.	09265-L10877 10q21	14	220	Ref.	12427-L13428 22q12
25	279	Ref.	12437-L13438 14q24	21	271	Ref.	15957-L26197 6q15
28	304	Ref.	16436-L18889 18q21	30	353	Ref.	06708-L26176 10p11
31	328	Ref.	05388-L04785 12p11	32	372	Ref.	08893-L23475 14q24
35	364	Ref.	05953-L05397 2p22	35	400	Ref.	07808-L23525 3p22
40	409	Ref.	08725-L08736 9q21	44	483	Ref.	06676-L06254 11p15
44	445	Ref.	05026-L29797 2q32				
46	463	Ref.	09908-L10321 16p13				

4.4.3 SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO

Se realizó un análisis mediante secuenciación de exoma completo (WES) de 11 muestras de MMNS, haciendo un análisis pareado de tumor y muestra de sangre periférica en 8 de ellos.

En los 3 casos en los que no se disponía de muestra de sangre periférica se empleó mucosa sana adyacente, asumiendo que la ausencia de afectación permitiría catalogar, con suficiente grado de seguridad, a las mutaciones encontradas en la muestra tumoral como somáticas.

4.4.4 INMUNOHISTOQUÍMICA.

La IHQ de todas las muestras tisulares fue realizada en una estación de trabajo de tinción automática *Dako Autostainer Plus* (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) con recuperación de antígenos mediante EnVision FLEX+Mouse. Los anticuerpos empleados en la IHQ fueron:

- pERK (MAPK) *rabbit anti-phospho-p44/42 clone D13.14.4E*, (Cell Signaling Technology, Cambridge, Reino Unido) a una dilución 1:500.
- pAKT (mTOR) *rabbit Akt-pS473 clone 14-5* (DAKO, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:20.
- Ki67 *mouse anti-Ki-67 clone MIB-1* (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

Las tinciones de pERK nuclear y/o citoplasmático y de Ki-67 nuclear fueron evaluadas por dos investigadores (CR y VBL) y cuantificadas en función del porcentaje de células tumorales positivas (0-100%).

4.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para el análisis bioinformático se empleó el software bioinformático *HD Genome One* (DREAMgenics, Oviedo, España), certificado con el marcaje CE-IVD de la forma descrita por Sánchez-Fernández et al.¹³⁶.

Durante el análisis bioinformático de los resultados de NGS mediante panel de genes se filtraron las variantes de secuencia con una frecuencia alélica en la población normal menor del 1%, considerándose únicamente los cambios no sinónimos con un impacto en la secuencia de la proteína.

Los 8 análisis pareados de tumor/línea germinal dieron resultados inequívocos sobre el estado somático de las variantes, y solo se consideraron relevantes aquellos con una frecuencia alélica mayor del 10% del total de lecturas en la muestra tumoral. En cuanto a los 2 casos de análisis únicamente del tumor, solo se tomaron en consideración variantes con más de 50 lecturas con el fin de evitar artefactos. Esto es debido a que en los MMNS, a diferencia de otros CNS como los adenocarcinomas de etmoides, la secuenciación tiene menos cobertura y aparecen muchos artefactos de secuenciación. Dado que el panel está diseñado para exones, aunque cubra ciertas regiones intrónicas, únicamente valoramos las variantes exónicas.

Se utilizó la información relativa a las variantes de número de copia (CNV) del panel de 120 genes secuenciados mediante NGS únicamente cuando indicaba deleciones de 0 copias o ganancias de 4 o más copias.

Tras la identificación de las variantes, estas fueron comparadas con bases de datos poblacionales, funcionales y relacionadas con enfermedades, que se detallan más adelante. Esta comparación permitió conocer su frecuencia alélica en la población, así como establecer relaciones genotipo-fenotipo y predecir la función de la variante, pudiendo así priorizar las mismas.

Se eliminaron las variantes silenciosas o sinónimas, manteniendo las mutaciones sin sentido (*missense, nonsense, frameshift*, inserciones y deleciones *inframe* y *splicing*). Se eliminaron las variantes con frecuencia alélica poblacional $>0,01$ en todas las bases de datos poblacionales evaluadas (dbSNP, ExAC, ESP y 1000 Genomas).

Para el análisis bioinformático de los resultados de NGS mediante WES se filtraron las variantes de secuencia eliminando aquellas que se presentaron con una frecuencia de lectura inferior al 10% en las muestras tumorales y superior al 1% en las muestras de sangre/mucosa sana adyacente, considerándose únicamente los cambios no sinónimos con un impacto en la secuencia de la proteína.

Se analizaron, inicialmente, las mutaciones identificadas en los exones. Sin embargo, dado que el *splicing* se codifica por secuencias adyacentes al exón, ciertos intrones fueron valorados. Las mutaciones consistentes en una pérdida de heterocigosidad (LOH) fueron descartadas, con el objetivo de identificar las mutaciones somáticas.

Las variantes descritas con una frecuencia superior al 1% en la población sana, y que traducirían un polimorfismo, fueron descartadas, de la misma forma que aquellas descritas como benignas, probablemente benignas o intrascendentes.

Por último, aquellas variantes que se identificaron en menos de 5 lecturas en la muestra tumoral fueron descartadas por la posibilidad de traducir una lectura insuficiente como para ser representativa.

Se describió tanto el número de variantes en cada caso como la distribución en función del tipo de variante.

Se consultaron las siguientes bases de datos para la anotación de variantes: COSMIC e ICGC para las relacionadas con la enfermedad; Clinvar, para las correlaciones genotipo-fenotipo; Esembl, CCDS, RefSeq y Pfam para el estudio de las variantes funcionales; y el score GERP++ para calcular la conservación del nucleótido afecto.

Finalmente, en base a la metodología publicada por Dienstmann et al.¹³⁸, se seleccionaron y priorizaron las variantes que cumplieran uno de las siguientes condiciones: o bien que estuviesen presentes como mutaciones somáticas en las bases de datos COSMIC, ICGC y/o Clinvar; o bien que tuvieran un impacto probable en la secuencia de las proteínas codificadas por los genes afectados.

Las variantes se anotaron según las directrices de la *Human Genome Variation Society* versión 20.5¹³⁹, autorizada por la *Human Genome Variation Society*, el *Human Variome Project* y la *Human Genome Organization*.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis bioestadístico se realizó con el apoyo y asesoría de la Unidad de Consultoría Estadística de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Se realizó un análisis descriptivo proporcionando distribuciones de frecuencias relativas y absolutas para variables cualitativas, y medidas de posición y dispersión para las cuantitativas.

Las relaciones entre variables cualitativas se analizaron con el test Chi Cuadrado de Pearson y el test de Fisher, en función de que verificase o no la hipótesis sobre frecuencias esperadas.

Se estimaron tasas de supervivencia a través del estimador Kaplan-Meier. Las diferencias en SG y SLE entre las diferentes vías se evaluaron mediante el test de Log-Rank.

Se construyeron, por último, modelos de regresión de Cox univariantes y multivariantes en cada caso para estimar los *Hazard Ratio* (HR) y sus intervalos de confianza al 95%.

El análisis estadístico se efectuó mediante el programa R (R Development Core Team), versión 3.6.0 y se emplearon las librerías pROC¹⁴⁰, OptimalCutpoints¹⁴¹ y survival¹⁴².

El nivel de significación empleado en todo el análisis fue 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 MUESTRA COMPLETA

5.1.1 DESCRIPCIÓN MUESTRAL

La muestra la conformaron 26 pacientes con un diagnóstico anatomopatológico e IHQ confirmado de MMNS, distribuidos de forma similar en cuanto al sexo (12 hombres (46%) y 14 mujeres (54%)) y con una edad media al diagnóstico de 74 años, dentro de un rango de edades que abarcaba desde los 49 hasta los 96 años. En todos los casos se trataba de individuos de origen europeo y nacionalidad española, excepto en un caso con origen sudamericano y nacionalidad colombiana.

En el análisis, tanto en lo relativo a los hábitos tóxicos como a los antecedentes ocupacionales, la tasa de datos perdidos fue demasiado alta como para arrojar resultados interpretables. En el análisis de los antecedentes personales médico-quirúrgicos, se tuvieron en cuenta los antecedentes de melanoma en cualquier localización corporal.

La manifestación clínica que más frecuentemente motivó la asistencia a la consulta fue la epistaxis, en un 54% de los casos, seguido de la insuficiencia respiratoria nasal en un 19%. En el resto de los pacientes, el síntoma de debut fue único para cada caso. El análisis pormenorizado de la distribución muestral en base al motivo de consulta se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2: Resumen de los principales motivos de consulta.	
	N.º (%)
Epistaxis	14 (54)
Insuficiencia respiratoria nasal	5 (19)
Diplopia	1 (4)
Lesión costrosa en fosa nasal	1 (4)
Tumoración columelar	1 (4)
Tumoración en paladar	1 (4)
Molestias oculares	1 (4)
Decoloración cutánea malar	1 (4)
Desconocido	1 (4)

Respecto a la localización, se disponen de 23 casos registrados, con un 11% de casos perdidos en esta magnitud. La fosa nasal fue el emplazamiento de la patología el 74% de los casos, seguido de los senos maxilar y etmoides, presentando dos casos una afectación conjunta de más de un seno. El análisis pormenorizado de la distribución muestral por frecuencias en base a la localización del tumor primario se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3: Resumen del emplazamiento del tumor primario.	
	N.º (%)
Fosa nasal	17 (74)
Seno maxilar	2 (8)
Etmoides	2 (8)
Seno maxilar y etmoides	1 (4)
Seno esfenoidal y etmoides	1 (4)

Se obtuvieron datos relativos a la pigmentación subjetiva del tumor primario únicamente en 11/26 casos (42%). De estos 11 pacientes, 9 presentaban datos macroscópicos de pigmentación descritos como coloración marronácea, violácea o negra. Únicamente 2 pacientes presentaban lesiones descritas como amelanóticas (8% del total).

Los marcadores IHQ más frecuentemente empleados en el análisis de nuestra muestra fueron la vimentina, S100, HMB45 y Melan-A. El marcador IHQ más frecuentemente positivo fue el S100 (85%) seguido de HMB45 y Melan-A (73% cada uno).

Al analizar el estadio clínico en el momento del diagnóstico, pormenorizamos en las categorías relativas al tumor primario (T), a los ganglios regionales (N) y a la existencia o no de metástasis a distancia (M). Se identificó que el 35% de los pacientes presentaban tumores primarios que se correspondían con la categoría clínica cT3, el 42% con la categoría T4a y el 23% con T4b. El 85% de los pacientes no presentaban metástasis ganglionares al diagnóstico y el 96% no presentaban metástasis a distancia. El análisis conjunto de estas categorías reflejó que el 31% de los pacientes presentaban un estadio III al diagnóstico, el 46% un estadio IVa y el 23% un estadio IVb. El análisis detallado de la distribución por frecuencias en base a la categoría TNM y el estadio se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de la categoría TNM y estadio al diagnóstico.		
		N.º (%)
T	T3	9 (35)
	T4a	11 (42)
	T4b	6 (23)
N	N0	22 (85)
	N1	4 (15)
M	M0	25 (96)
	M1	1 (4)
Estadio	III	8 (31)
	IVa	12 (46)
	IVb	6 (23)

En lo relativo al tratamiento, 2 pacientes no recibieron ningún tratamiento con intención curativa por lo avanzado del estadio de su enfermedad y su deterioro físico: uno de los pacientes no recibió ningún tipo de tratamiento activo (sí medidas sintomáticas), mientras que el otro recibió QT con intención paliativa.

El 92% de los pacientes recibieron tratamiento quirúrgico como primera modalidad terapéutica, el 63% de ellos por vía endoscópica mediante CENS. Entre aquellos que recibieron tratamiento quirúrgico abierto se realizó un abordaje paralateronasal en el 78%, mientras que en casos puntuales se realizaron otros abordajes, a demanda del tumor primario. Cabe destacar que a partir de 2014, todos los pacientes, independientemente de estadio tumoral, fueron tratados mediante CENS.

Únicamente dos pacientes (8%) recibieron un vaciamiento ganglionar complementando el tratamiento quirúrgico en el mismo tiempo. En los dos casos se realizó un vaciamiento ganglionar funcional (VGF) bilateral por la presencia de metástasis ganglionares clínicas. Otros dos pacientes recibieron, de forma adicional, un vaciamiento ganglionar selectivo (VGS) unilateral diferido en el curso de la evolución de la patología, como forma de rescate quirúrgico ante el fracaso regional.

En el estudio anatomopatológico de los bordes de resección tumoral, identificamos un 50% de casos perdidos en esta magnitud. En lo relativo al 50% de la muestra en la que sí que se analizaron de forma pormenorizada los límites de resección, el 61% de los casos demostraron estar libres de enfermedad residual, frente a un 38% que se encontraban afectados. De los 5 pacientes con afectación tumoral de los límites de resección, 3 habían sido intervenidos mediante CENS y 2 mediante abordajes abiertos por lo que, independientemente de la técnica quirúrgica, se logró una resección R0 en un 23% de los pacientes y una resección macroscópicamente negativa pero microscópicamente afecta (R1) en menos del 20%. Únicamente en 2 casos no se logró realizar una resección macroscópica del tumor (R2). Los datos relativos al estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica y los límites de resección se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5: Distribución muestral por frecuencias en base a los resultados quirúrgicos.		
Bordes		N.º (%)
	Libres	8 (62)
	Afectos	5 (38)
		CENS 3 (60)
		Abierta 2 (40)
	N/A	13 (50)
Resección	R0	6 (23)
	R1	5 (19)
	R2	2 (8)
	N/A*	13 (50)

Nota. N/A corresponde a datos perdidos.

El 35% de los pacientes recibieron tratamiento RT, 4 de ellos con intencionalidad adyuvante y otros 4 con intención paliativa (44% del total de pacientes radiados en cada caso). Solamente un paciente recibió tratamiento con RT con intención radical. Como tratamiento sistémico, un paciente adicional recibió bioquimioterapia basada en el interferón, de forma paliativa. Ningún paciente recibió otro tipo de terapia sistémica como parte de su tratamiento. El análisis detallado de la distribución muestral por frecuencias en base al tratamiento recibido se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6: Distribución muestral por frecuencias en base al tratamiento recibido.		
		N.º (%)
Cirugía		24 (92)
	Abierta	9 (37)
	CENS	15 (63)
	Vaciamiento	2 (8)
RT		9 (35)
	Radical	1 (4)
	Adyuvante	4 (15)
	Paliativa	4 (15)
Bioquimioterapia		1 (4)
Inmunoterapia		0 (0)
Terapias dirigidas		0 (0)

Respecto a la evolución de la enfermedad considerada como fracaso terapéutico, se disponen de 23 casos registrados, con un 11% de casos perdidos en esta magnitud. En el 74% de los pacientes la enfermedad recidivó, frente a un 26% en los que se logró el control de la enfermedad con el primer tratamiento. En esos 17 pacientes en los que se produjo el fracaso terapéutico, se cuantificaron un total de 34 recidivas, con una media de 2 recidivas por paciente y un rango de 1 a 7. Se identificó persistencia tumoral en un 15% de los casos y recidiva a nivel local en el 42%. El 26% recidivaron regionalmente y el 26% desarrollaron metástasis a distancia. El 30% de los casos presentaron fracasos terapéuticos a más de un nivel. El análisis de la distribución muestral en base al fracaso terapéutico se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7: Resumen de la distribución muestral del fracaso terapéutico.		N.º (%)
No		6 (26)
Sí		17 (74)
	Persistencia	4 (15)
	Local	11 (42)
	Regional	6 (26)
	A distancia	6 (26)
	Local + Regional	2 (8)
	Local + A distancia	3 (12)
	Local + Regional + A distancia	2 (8)
	Persistencia + A distancia	1 (4)

5.1.2 RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO

Al finalizar el seguimiento, se conocía el estado de 23 pacientes, con un 11,5% de casos perdidos. El 19% de los pacientes estaban vivos al final del seguimiento frente a 69% que fallecieron durante el mismo. El 50% de los pacientes fallecieron por el tumor y el 19% lo hicieron por causas intercurrentes. Los datos relativos al estado final tras el seguimiento se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8: Distribución de frecuencias del estado al finalizar el seguimiento.	
	N.º (%)
Vivo	5 (19)
Muerto por tumor	13 (50)
Muerto por otras causas	5 (19)
Perdido	3 (12)

5.1.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

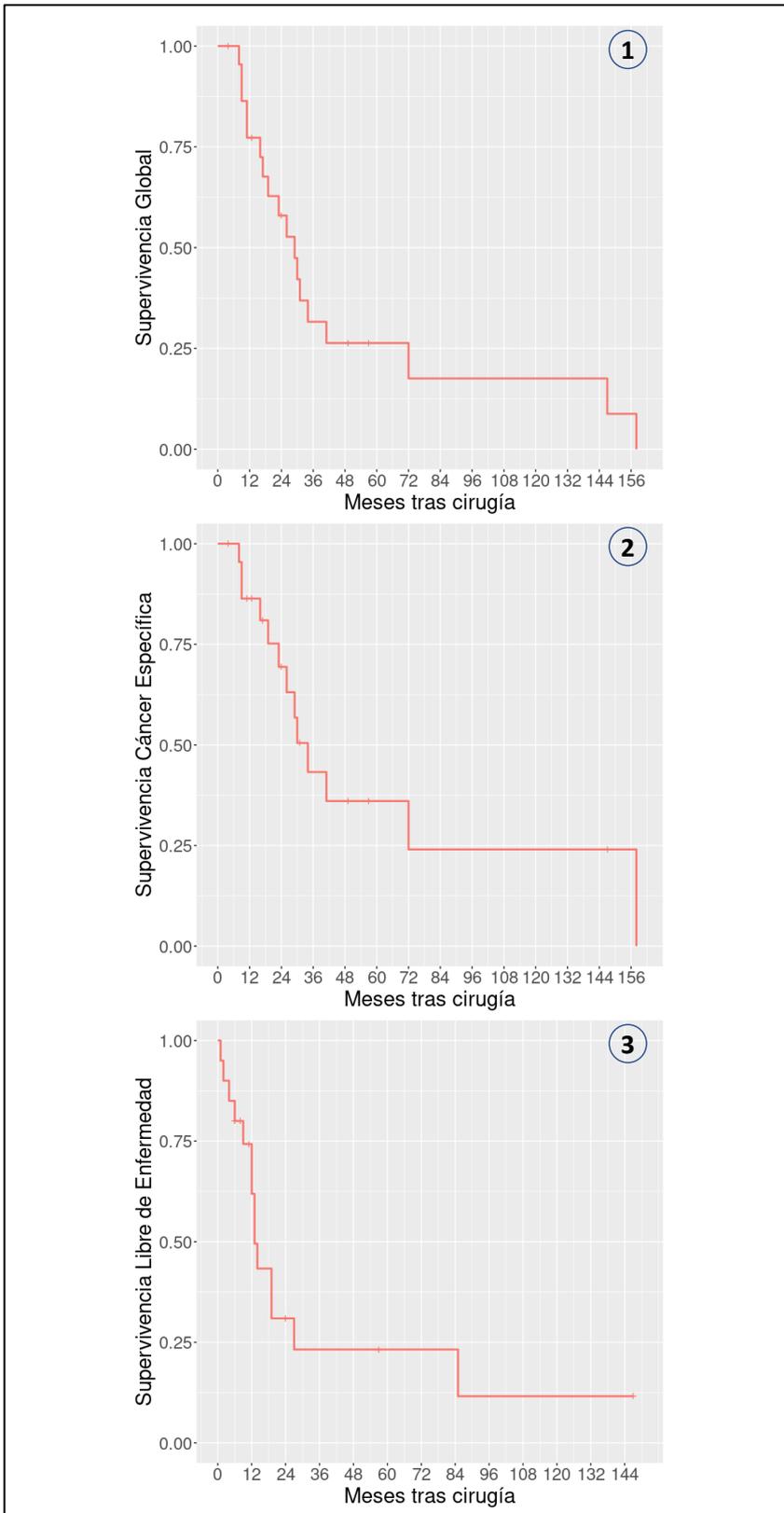
Tras finalizar el seguimiento, se disponía de datos de registro de 23 de los 26 casos, el 88% del total. El análisis de supervivencia se encuentra representado gráficamente en la Figura 5.

Se cuantificaron 18 *exitus*, siendo la mediana del tiempo de supervivencia de 29 meses (rango 4 – 158 meses) tras la cirugía, con una tasa de SG del 77% al año, del 58% a los 2 años y del 32% a los 3 años. Al analizar las causas específicas de fallecimiento de los pacientes que componían la muestra, se identificaron 13 *exitus* secundarios al tumor. La mediana del tiempo de SEE fue 34 meses tras la cirugía y la tasa de SEE al año fue del 86%, a los 2 años del 69% y del 43% a los 3 años.

Se identificó una recidiva de la enfermedad en 14 casos, con una mediana del tiempo libre de enfermedad de 13 meses (rango 0 – 85 meses) y una tasa de SLE del 62% al año, del 31% a los 2 años y del 23% a los 3 años.

Figura 5

Representación gráfica del análisis de supervivencia.



Nota. Representación del Kaplan-Meier relativo a la SG (1), SEE (2) y SLE (3).

Se realizó un estudio de las posibles diferencias en las curvas de supervivencia en base a los distintos grupos de variables clínicas cualitativas, empleando el test de Fisher. Los resultados de dicho análisis se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9: Relación entre las variables clínicas cualitativas y la supervivencia.				
Variable		p-valor		
		SG	SLE	SEE
Sexo	Hombre	0.64	1	0.68
	Mujer			
Motivo de consulta	Epistaxis			
	IRN*	0,539	0,539	0,534
	Otras			
Localización	Fosa nasal	0,53	0,249	1
	Senos paranasales			
Estadio	T3			
	T4a	0,292	0,823	0,848
	T4b			
	N0	1	1	0,604
	N1			
	M0	1	1	0,435
	M1			
	III			
	IVa	0,27	1	0,601
IVb				
Cirugía	Abierta	0,045	1	0,08
	CENS			
	Bordes libres	0,491	1	1
	Bordes afectos			
	Resección R0			
	Resección R1	0,253	0,79	0,656
Resección R2				
RT	Sí	0,274	1	1
	No			
Recidiva	Sí	-	-	0,052
	No			

Nota: IRN corresponde a insuficiencia respiratoria nasal. En negrita se señala el p-valor que determina significación estadística.

Este análisis únicamente identificó el abordaje quirúrgico como variable que influía de forma significativa en la aparición del suceso “*exitus* de cualquier causa” (SG), determinando una mayor incidencia de *exitus* en el grupo tratado mediante abordajes abiertos frente a los abordajes endoscópicos ($p=0,045$). Estos hallazgos no pudieron ser replicados para la SLE ni la SEE.

Se construyeron modelos de regresión de Cox que, empleando como predictoras ciertas variables clínicas, buscaban predecir el *exitus* por cualquier causa (SG), el *exitus* secundario al tumor (SEE) y la aparición de recidivas (SLE). Estos modelos de regresión muestran los HR junto con el intervalo de confianza al 95% asociado para cada modelo univariante construido, así como para el modelo multivariante final estimado, en el que ninguna variable alcanzó la significación estadística. Fue preciso eliminar algunas de las variables clínicas por el reducido número de casos de los que se disponía. Los resultados pormenorizados de dichos modelos de regresión pueden consultarse en el apartado Material Suplementario 1.

5.2 MUESTRA CON ESTUDIO GENÉTICO

Por la cantidad y calidad de las muestras, únicamente se pudo realizar la técnica de secuenciación detallada en el apartado de Material y Métodos, en el 58% de los casos (Figura 4).

5.2.1 DESCRIPCIÓN MUESTRAL

La muestra analizada en este apartado la compusieron los 15 pacientes con un diagnóstico anatomopatológico e IHQ confirmado de MMNS, en los que la obtención y conservación de la muestra permitió que los tejidos preservaran las propiedades suficientes para realizar sobre ellos el análisis genético y molecular con garantías.

Estuvo conformada por 7 hombres (46,7%) y 8 mujeres (53,3%), con una edad media al diagnóstico de 71,3 años, dentro de un rango de edades que abarcaba desde los 49 hasta los 88 años, todos de raza caucásica europea.

Los datos relativos a la distribución de la muestra en cuanto a las diferentes variables clínicas analizadas, se detalla de forma conjunta en la Tabla 10

La fosa nasal fue el emplazamiento primario del tumor en el 80% de los casos, seguido de los senos maxilar y etmoides. En ningún paciente la patología se localizó en los senos esfenoidal ni frontal. Tampoco se describieron combinaciones de senos afectados en esta muestra.

Analizando el estadio clínico en el momento del diagnóstico, de nuevo pormenorizamos en las categorías T, N y M, identificando que un tercio de los pacientes presentaban tumores primarios cuya extensión local se correspondía con la categoría clínica cT3, aproximadamente el 50% con la categoría T4a y el 20% con T4b. Solamente dos pacientes presentaban metástasis ganglionares al diagnóstico y ninguno metástasis a distancia. El análisis conjunto de estas categorías reflejó que más de la mitad de la muestra se diagnosticó en un estadio clínico IVa.

En lo relativo al tratamiento, la cirugía fue el tratamiento primario de elección en todos los casos, en más del 90% de ellos con intención curativa. La proporción de la muestra que se sometió a un abordaje abierto (47%) fue similar a la sometida a un abordaje endoscópico (53%). Conviene destacar que a partir de 2014, todos los pacientes, independientemente de estadio tumoral, fueron tratados mediante CENS.

En 4 pacientes, el tratamiento quirúrgico del tumor local fue complementado con tratamiento sobre los ganglios linfáticos regionales. En 2 casos, en los que se demostraron metástasis ganglionares clínicamente positivas se realizó un VGF bilateral en el mismo tiempo quirúrgico. En los otros 2 casos se realizó un VGS unilateral en un segundo tiempo, como rescate quirúrgico tras el fracaso regional.

Respecto a la evolución de la enfermedad considerada como fracaso terapéutico, se disponen de 15 casos registrados, sin casos perdidos en esta magnitud. El 60% de los pacientes desarrolló una recidiva locorregional o a distancia, frente a un 40% en el que se logró el control de la enfermedad con el primer tratamiento. En esos 9 pacientes en los que se confirmó el fracaso terapéutico, se cuantificaron un total de 25 recidivas, con una media de 2,7 recidivas por paciente y un rango de 1 a 7. El patrón de fracaso terapéutico más frecuente fue la recidiva local (próxima al 50%), seguida del desarrollo de metástasis a distancia (33%) y la recidiva regional (27%).

El 75% de los pacientes que desarrollaron metástasis ganglionares, lo hicieron a nivel cervical mientras que un caso lo hizo a nivel mediastínico. En cuanto a las metástasis a distancia, el emplazamiento más frecuente de estas fue el pulmón (80%), seguido de hueso (60%) e hígado (40%).

El 40% de los casos presentaron fracasos terapéuticos en más de un nivel y el 80% de los pacientes que desarrollaron metástasis a distancia, lo hicieron en múltiples localizaciones.

5.2.2 RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO

Al finalizar el seguimiento, se conocía el estado de 14 pacientes, con un 6,7% de datos perdidos en esta magnitud. El 13% de los pacientes estaban vivos al final del seguimiento frente a 80% que fallecieron durante el mismo, el 60% consecuencia directa del tumor.

Tabla 10: Distribución de las variables analizadas en la muestra con estudio genético.		
Variable		N.º (%)
Localización	Fosa nasal	12 (80)
	Seno maxilar	2 (13)
	Etmoides	1 (7)
	Esfenoides	0 (0)
	Frontal	0 (0)
	Combinaciones	0 (0)
Estadio	T3	5 (33)
	T4a	7 (47)
	T4b	3 (20)
	N0	13 (87)
	N1	2 (13)
	M0	15 (100)
	M1	0 (0)
	III	4 (27)
	IVa	8 (53)
IVb	3 (20)	
Cirugía	Abierta	7 (47)
	CENS	8 (53)
	Vaciamiento	4 (27)
RT	Radical	0 (0)
	Adyuvante	5 (33)
	Paliativa	0 (0)
Bioquimioterapia		1 (7)
Inmunoterapia		0 (0)
Terapias dirigidas		0 (0)
Fracaso terapéutico	No	6 (40)
	Persistencia	1 (7)
	Local	7 (47)
	Regional	4 (27)
	A distancia	5 (33)
	Local + Regional	1 (7)
	Local + A distancia	3 (20)
	Local + Regional + A distancia	2 (13)
Estado final	Vivo	2 (13)
	Muerto por tumor	9 (60)
	Muerto por otras causas	3 (20)
	Perdido	1 (7)

5.2.3 RESULTADOS DE LA SECUENCIACION

5.2.3.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

La NGS mostró una o más variantes de frecuencia no sinónimas, con efecto sobre la secuencia de aminoácidos, en 5 de los 8 pares tumor-línea germinal, con un promedio de 2 variantes por tumor (rango 1-4), mientras que 3 tumores no albergaban ninguna mutación somática en ninguno de los 120 genes analizados.

El gen más frecuentemente alterado fue NF1, en 3/8 casos, 2 de ellos con mutaciones sin sentido o de empalme (*truncating or splice mutations*) que dieron lugar a proteínas truncadas y uno con una pérdida parcial en el número de copias del gen. Se identificaron otras mutaciones patogénicas afectando a NRAS en 2 casos así como en CDKN2A, APC y ATM, cada una afectando a un caso.

La secuenciación de los casos que únicamente presentaban muestra tumoral (casos 7 y 10) demostró la existencia de 9 y 15 mutaciones respectivamente, sin poder valorar si se trataba de mutaciones somáticas. De acuerdo con el algoritmo predictor de Varsome, las variantes en NF1, KRAS, MITF, FGFR1 y FGFR2 identificadas en el caso 10, fueron consideradas patogénicas o probablemente patogénicas. Varsome no indicó la existencia de variantes probablemente patogénicas en el caso 7.

El análisis de las CNV demostró la existencia de 4 alteraciones del tipo CNV distribuidas en 3 casos. Este análisis permitió identificar la pérdida del número de copias a nivel del gen NF1 en el caso 4. Adicionalmente identificamos 3 variaciones del tipo ganancia distribuidas en dos casos, afectando a los genes OTX1, MYC y PRDM14. El análisis pormenorizado de las CNV puede consultarse, de forma adicional, en el apartado Material Suplementario 2.

Los resultados de la NGS tras aplicar los filtros descritos en la sección de Material y Métodos dirigidos a aumentar la potencia restrictiva y la robustez del análisis se detallan en la Tabla 11 y se encuentran representados de forma gráfica en la Figura 6.

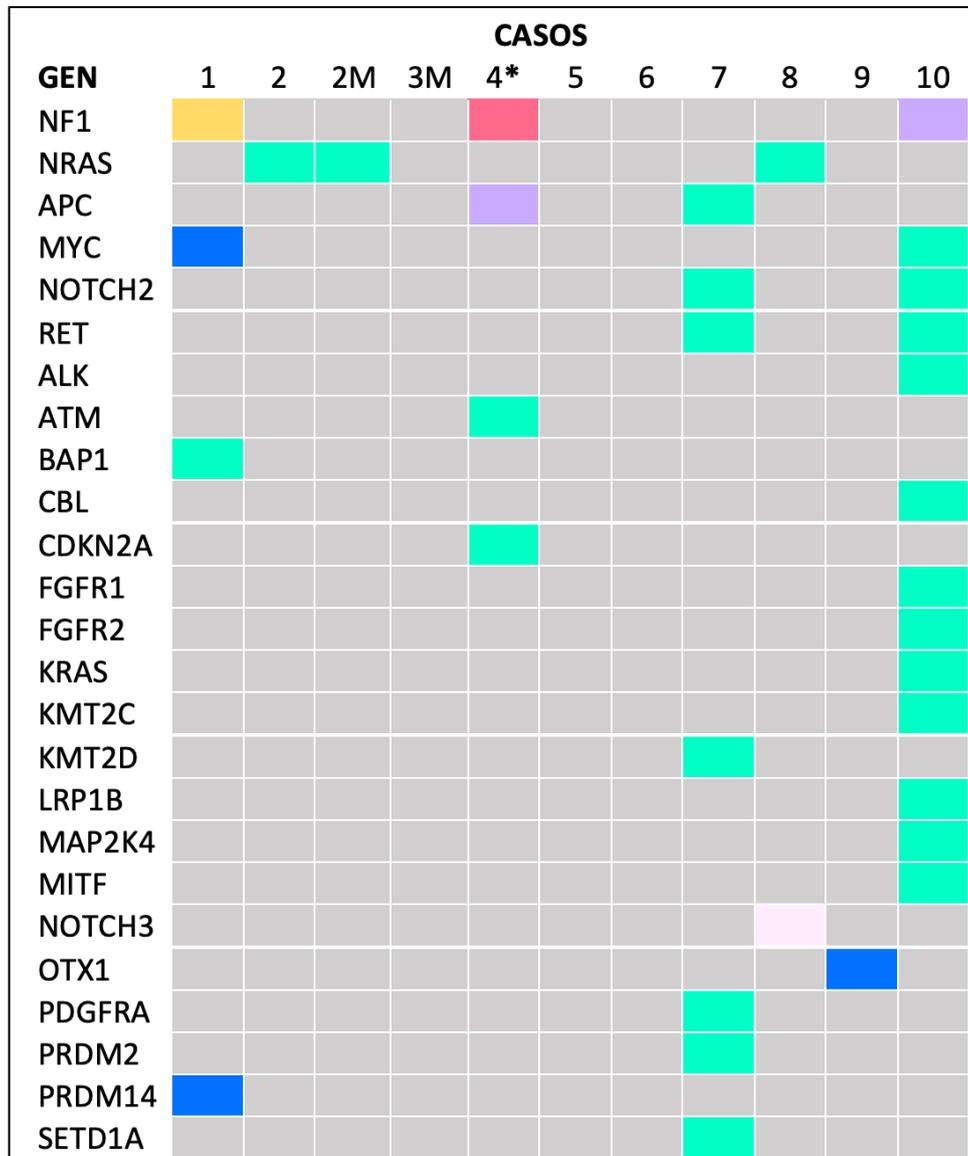
Tabla 11: Resultado de la NGS mediante panel de genes de las 10 muestras de MMNS tras aplicar el filtro descrito.								
Caso	Gen	c.Hgys	p.Hgys	Frecuencia SP*	Frecuencia T**	Lecturas T**	Lecturas	Tipo de mutación
1	BAP1	c.505C>T	p.His169Tyr	0	0,869976359	368	397	Somática
	NF1	c.4923G>A	p.Trp1641*	0	0,32731377	145		Somática
2	NRAS	c.183A>T	p.Gln61His	0	0,435294118	111	324	Somática
2 met	NRAS	c.183A>T	p.Gln61His	0	0,380392157	97	348	Somática
3	-	-	-	-	-	-	301	-
4	CDKN2A	c.143C>T	p.Pro48Leu	0,053977273	0,413294798	286 (38 MS)	408	Probable somática
	APC	c.1186dupG	p.Asp396Glyfs*2	0,052050473	0,726190476	305 (33 MS)		Probable somática
	APC	c.6821C>T	p.Ala2274Val	0,519094767	0,916184971	317		Germinal
	ATM	c.332G>A	p.Arg1111Lys	0,041958042	0,779411765	53 (6 MS)		Probable somática
5	-	-	-	-	-	-	409	-
6	-	-	-	-	-	-	420	-
7	PRDM2	c.3070T>A	p.Ser1024Thr	NA	0,612903226	76	314	NA
	NOTCH2	c.3980A>G	p.Asp1327Gly	NA	0,55049505	278		NA
	PDGFRA	c.2365G>C	p.Gly789Arg	NA	0,456221198	198		NA
	APC	c.1019C>T	p.Ser340Phe	NA	0,166666667	73		NA
	RET	c.2944C>T	p.Arg982Cys	NA	0,162280702	37		NA
	KMT2D	c.13649C>T	p.Ala4550Val	NA	0,131313131	52		NA
	KMT2D	c.12028T>C	p.Ser4010Pro	NA	0,604989605	291		NA
	KMT2D	c.248G>A	p.Arg83Gln	NA	0,533742331	174		NA
	SETD1A	c.1165C>T	p.Arg389Trp	NA	0,821086262	257		NA
8	NRAS	c.181C>A	p.Gln61Lys	0	0,313609467	53	212	Somática
	NOTCH3	c.3399C>A	p.His1133Gln	0,48156682	0,785714286	165		Germinal
9	-	-	-	-	-	-	388	-

Continuación de la Tabla 11.								
10	NOTCH2	c.4238T>A	p.Leu1413His	NA	0,266106443	95	279	NA
	ALK	c.1427T>C	p.Val476Ala	NA	0,281632653	69		NA
	LRP1B	c.13114A>T	p.Asn4372Tyr	NA	0,70661157	171		NA
	LRP1B	c.11227G>A	p.Gly3743Ser	NA	0,677419355	147		NA
	MITF	c.1255G>A	p.Glu419Lys	NA	0,561170213	211		NA
	KMT2C	c.2294A>G	p.Glu765Gly	NA	0,143564356	87		NA
	FGFR1	c.1375G>T	p.Gly459Trp	NA	0,110320285	62		NA
	MYC	c.77A>G	p.Asn26Ser	NA	0,765957447	288		NA
	RET	c.166C>A	p.Leu56Met	NA	0,122516556	37		NA
	FGFR2	c.301A>G	p.Ile101Val	NA	0,876373626	319		NA
	CBL	c.1289T>C	p.Val430Ala	NA	0,739247312	275		NA
	KRAS	c.38G>A	p.Gly13Asp	NA	0,369565217	85		NA
	MAP2K4	c.770C>T	p.Ser257Phe	NA	0,603030303	199		NA
	NF1	c.73dupA	p.Thr25Asnfs*13	NA	0,470967742	73		NA
	NF1	c.5371_5373del	p.Phe1791del	NA	0,203910615	73		NA

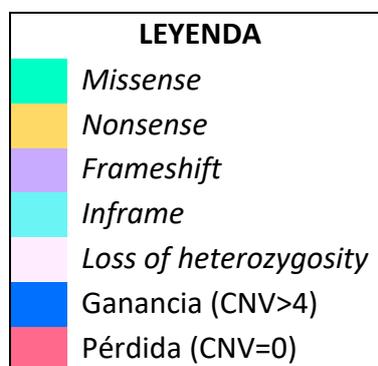
Nota. SP* corresponde con muestra en sangre periférica y T** corresponde con muestra tumoral.

Figura 6

Mutaciones identificadas mediante el panel de genes en los casos 1-10.



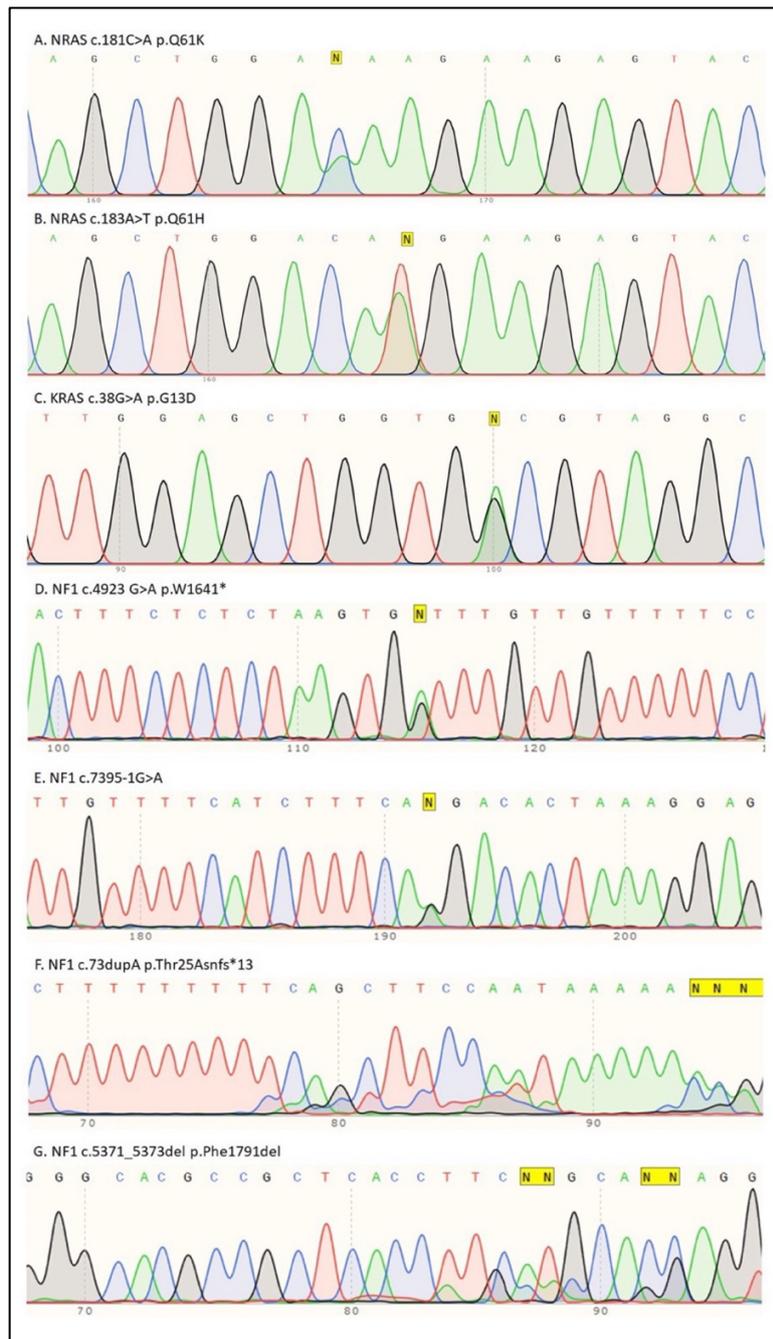
Nota. El asterisco identifica el caso en el que se identificó una delección intragénica en NF1.



Las mutaciones en la ruta MAPK, en los genes NF1, NRAS y KRAS, identificadas a través del panel de genes fueron confirmadas mediante secuenciación con PCR tipo Sanger. Estos hallazgos se muestran gráficamente representados en la Figura 7.

Figura 7

Mutaciones identificadas en genes de la ruta MAPK



Nota. Se pueden apreciar las mutaciones *missense* activadoras en NRAS (A y B) y KRAS (C), y mutaciones tipo *nonsense*, *splice*, *frameshift* y *delección inframe* en el gen NF1 (D, E, F y G respectivamente).

En las 5 muestras tumorales adicionales procedentes de bloques parafinados (casos 11-15) no se pudieron identificar mutaciones en las regiones *hotspot* de NRAS, KRAS, HRAS o BRAF.

Se realizó un análisis MLPA del gen NF1 en el caso en que se detectó la delección en dicho gen (caso 10), que confirmó la existencia de una pérdida parcial en el gen NF1 con un ratio tumor/normal de 1,03 para los exones de 1-30 y un ratio de 0,08 para los exones de 31-58, indicando una delección homogénea. Los resultados de dicho análisis se representan gráficamente en la Figura 8.

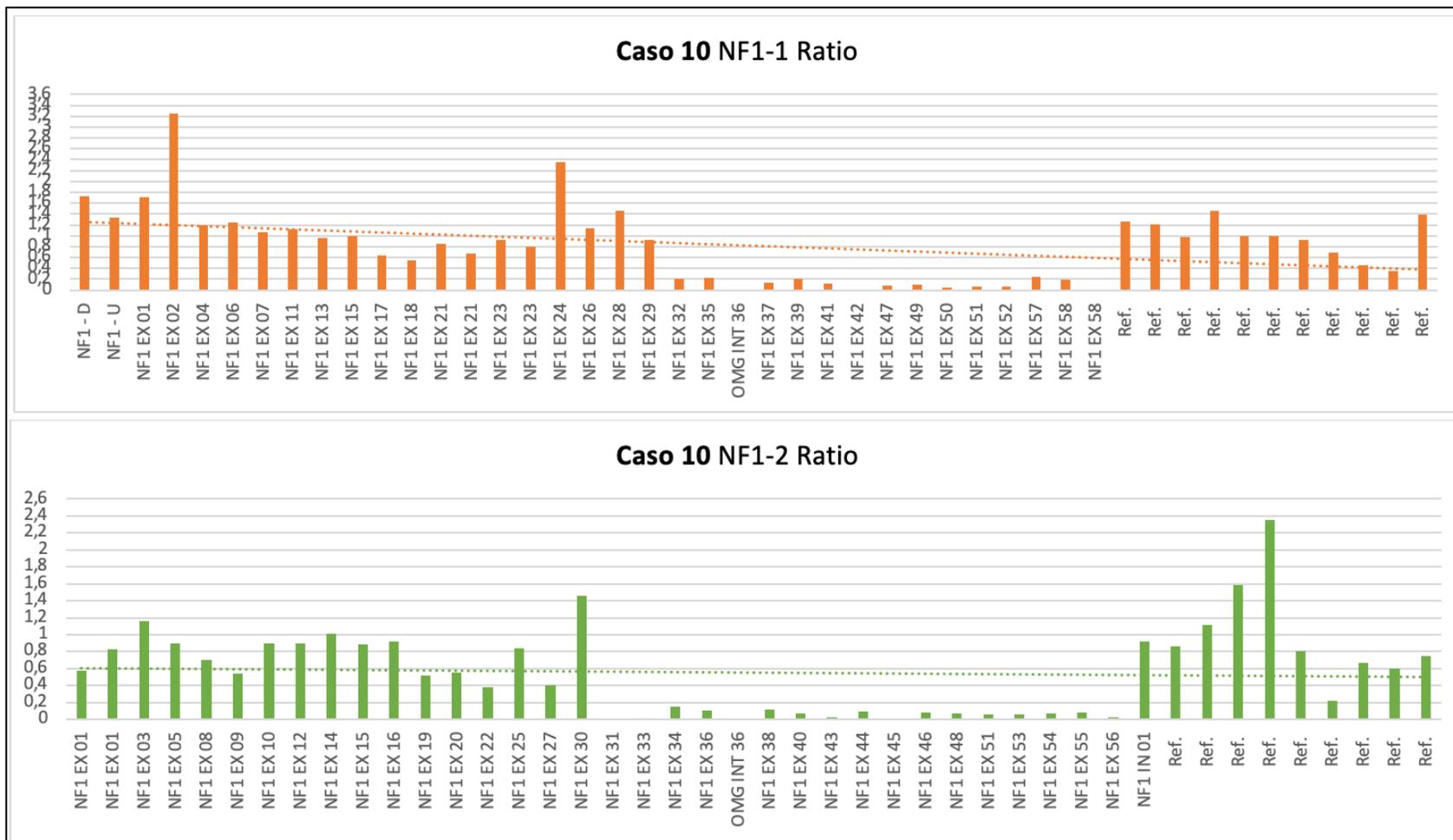
Dicho hallazgo suscitó el análisis de las 14 muestras tumorales restantes, lo que reveló en un caso adicional (caso 13) la existencia de una pérdida parcial de NF1, con un ratio tumor/normal de 0,67 para los exones de 1-14 y de 41-58, y un ratio de 0,25 para los exones de 15-40. Dichos resultados se representan gráficamente en la Figura 9.

En ambas representaciones gráficas, cada pico proporciona una medida de la cantidad de ADN que se une a la sonda de ese exón. Esta cantidad está normalizada, por una parte, con las muestras de genes referencia que incluye el *kit* en cada muestra y a su vez con una media obtenida de varias muestras de ADN no tumoral para cada sonda. En los casos en los que se pierde parte del gen se aprecia como, a partir de un punto, los picos descienden notablemente respecto al resto de sondas.

Los datos adicionales con respecto al análisis MLPA de las restantes muestras tumorales, pueden ser consultados complementariamente, en el apartado Material Suplementario 3.

Figura 8

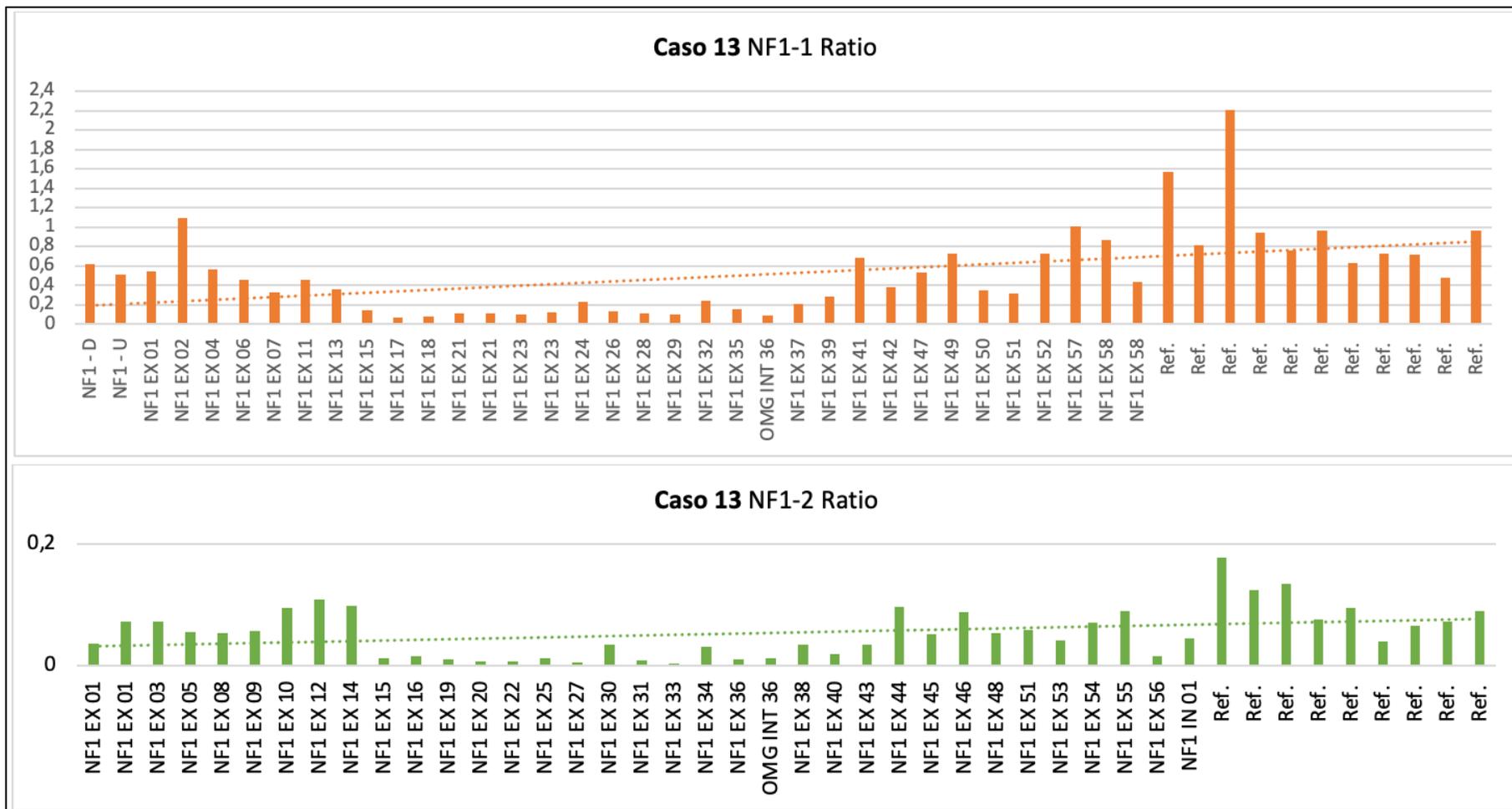
Análisis MLPA del caso 10.



Nota. Se aprecia la pérdida de información en los exones 31 a 58, indicativo de una deleción homogénea.

Figura 9

Análisis MLPA del caso 13.



Nota. Se aprecia la pérdida de información en los exones 15 a 40, indicativo de una deleción homogénea.

El análisis mediante WES permitió identificar un total de 1.667 variantes distribuidas entre los 11 casos. Pese a que las variantes se distribuyeron con una media de 151 variantes por caso, el 55% de las mismas las acumulaban 2 casos (el caso 2 presentó 664 variantes y el caso 11 presentó 259), por lo que, excluyendo estos dos casos, la media en los restantes 9 casos fue de 83 variantes por caso.

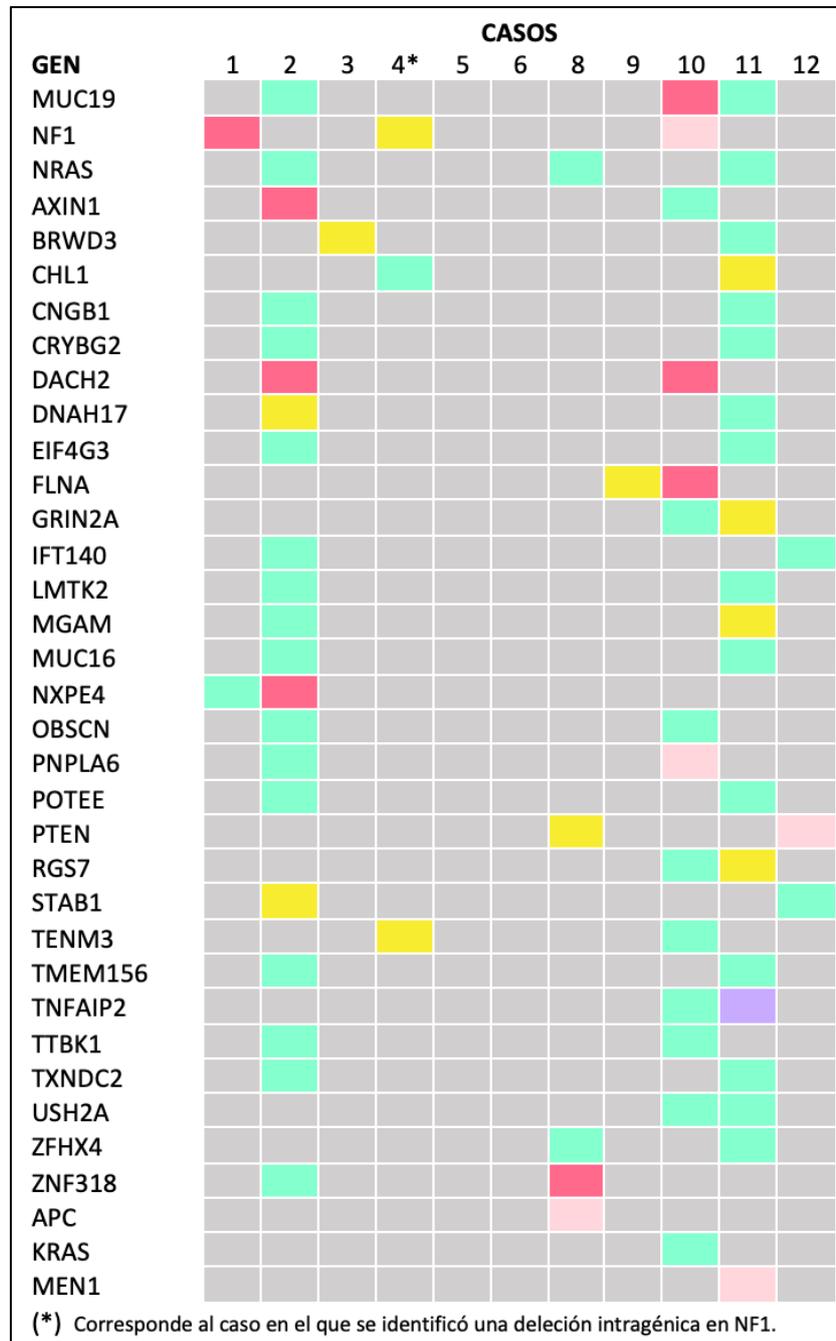
Únicamente 32 variantes (2%) se encontraban presentes en más de un caso y fueron analizadas, lo cual se encuentra representados de forma gráfica en la Figura 10 y se detalla en la Tabla 12. Se añadieron al análisis 3 variantes que, por la implicación conocida del gen alterado en la carcinogénesis humana, fueron considerados merecedores del mismo, pese a identificarse en un solo caso cada una. Estas variantes afectaban a los genes KRAS, MEN1 y APC.

No se identificaron mutaciones en los elementos críticos de la ruta MAPK que no se hubiesen identificado en el análisis previo. Sí identificamos alteraciones probablemente patogénicas en 4 casos (36% de la serie analizada) en 2 componentes de la ruta PI3K-AKT-mTOR: PTEN y EIF4G3.

De forma interesante, en 3 de estos casos (caso 2, 8 y 11) la mutación en PI3K-AKT-mTOR existía en comutación con NRAS. Dicho carácter no exclusivo también se apreció entre elementos de la ruta MAPK en la que el caso 10 demostró albergar mutaciones en NF1 y KRAS.

Figura 10

Mutaciones identificadas mediante WES en los casos 1-12.



Nota. Pese a que la Figura 10 se numere de 1 a 12, solo se analizaron 11 casos por la ausencia del caso 7.



Tabla 12: Resultado de la WES de los 11 MMNS.							
Caso	Gen	c.Hgys	p.Hgys	Frecuencia variante SP*	Frecuencia variante T**	Lecturas variante T**	Tipo de mutación
1	NF1	c.4923G>A	p.Trp1641*	0	0,460176991	52	Somática
	NXPE4	c.955C>T	p.His319Tyr	0	0,333333333	21	Somática
2	AXIN1	c.2146G>T	p.Glu716*	0	0,275862069	8	Somática
	CNGB1	c.1306G>A	p.Glu436Lys	0	0,646551724	75	Somática
	CRYBG2	c.2201C>T	p.Thr734Met	0	0,480314961	61	Somática
	DACH2	c.199G>T	p.Glu67*	0	0,798319328	95	Somática
	DNAH17	c.6670-8C>T		0	0,432432432	16	Somática
	EIF5G3	c.1486C>G	p.Pro496Ala	0	0,509615385	53	Somática
	IFT140	c.685G>A	p.Ala229Thr	0	0,517857143	87	Somática
	LMTK2	c.3176C>T	p.Thr1059Met	0	0,539936102	169	Somática
	MGAM	c.1911A>C	p.Arg637Ser	0	0,495049505	50	Somática
	MUC16	c.38273C>T	p.Ser12758Phe	0	0,27027027	10	Somática
	MUC19	c.12815T>C	p.Ile4272Thr	0	0,203036053	169	Somática
	NRAS	c.183A>T	p.Gln61His	0	0,425287356	37	Somática
	NXPE4	c.686T>A	p.Leu229*	0	0,551401869	59	Somática
	OBSCN	c.23344T>G	p.Phe7782Val	0	0,523255814	135	Somática
	PNPLA6	c.2245G>A	p.Val749Met	0	0,121621622	18	Somática
	POTEE	c.13G>A	p.Val5Ile	0	0,43902439	36	Somática
	STAB1	c.584-5C>T		0	0,791666667	19	Somática
	TMEM156	c.814G>A	p.Val272Ile	0	0,514018692	55	Somática
	TTBK1	c.1946C>G	p.Pro649Arg	0	0,467391304	129	Somática
	TXNDC2	c.490C>G	p.Pro164Ala	0	0,458515284	210	Somática
	ZNF318	c.1220G>T	p.Ser407Ile	0	0,566037736	90	Somática
3	BRWD3	c.1087-12_1087-11del		0	0,37037037	30	Somática
4	CHL1	c.1747G>A	p.Gly583Ser	0	0,125	8	Somática
	NF1	c.7395-1G>A		0	0,179487179	7	Somática
	TENM3	c.3235+3A>T		0	0,119402985	8	Somática

Continuación Tabla 12.							
5	-			-			
6	-			-			
8	APC	c.5903_5912dup.	p.Leu1972Serfs*6	0	0,242424	16	Somática
	NRAS	c.181C>A	p.Gln61Lys	0	0,469027	53	Somática
	PTEN	c.802-1G>A		0	1	8	Somática
	ZFH4	c.1456G>C	p.Glu486Gln	0	0,173835	97	Somática
	ZNF318	c.5699C>A	p.Ser1900*	0	0,320261	49	Somática
9	FLNA	c.2565+5G>T		0,004166667	0,108280255	34	Somática
10	AXIN1	c.437G>A	p.Arg146Gln	0	0,557894737	106	Somática
	DACH2	c.166G>T	p.Gly56*	0	0,483965015	166	Somática
	FLNA	c.7944A>T	p.*2648Cys	0	0,479651163	165	Somática
	GRIN2A	c.3958C>A	p.Leu1320Met	0	0,605633803	86	Somática
	KRAS	c.38G>A	p.Gly13Asp	0	0,52	13	Somática
	MUC19	c.13387G>T	p.Gly4463*	0	0,402209945	364	Somática
	NF1	c.5371_5373del	p.Phe1791del	0	0,197478992	47	Somática
	OBSCN	c.12025G>A	p.Asp4009Asn	0	0,301401869	129	Somática
	PNPLA6	c.2512dupC	p.Leu838Profs*17	0	0,192727273	53	Somática
	RGS7	c.46G>A	p.Asp16Asn	0	0,308219178	45	Somática
	TENM3	c.5777C>T	p.Thr1926Met	0	0,717514124	127	Somática
	TNFAIP2	c.809G>A	p.Cys270Tyr	0	0,16744186	36	Somática
	TTBK1	c.1430G>A	p.Arg477Gln	0	0,230414747	50	Somática
	USH2A	c.4241C>T	p.Ala1414Val	0	0,302325581	26	Somática
11	BRWD3	c.1645G>A	p.Glu549Lys	0	0,695652174	32	Somática
	CHL1	c.2473C>T	p.Pro825Ser	0	0,592592593	32	Somática
	CNGB1	c.604G>A	p.Glu202Lys	0	0,142857143	7	Somática
	CRYBG2	c.2186G>A	p.Gly729Glu	0	0,348484848	46	Somática
	DNAH17	c.2862G>A	p.Met954Ile	0	0,2	21	Somática
	EIF4G3	c.2276G>A	p.Arg759Gln	0	0,393939394	13	Somática
	GRIN2A	c.3544G>A	p.Asp1182Asn	0	0,529411765	171	Somática

Continuación Tabla 12.							
	LMTK2	c.2785C>T	p.Pro929Ser	0	0,320895522	43	Somática
	MEN1	c.69dupT	p.Ala24Cysfs*93	0	0,722627737	99	Somática
	MGAM	c.5005-8C>T		0	0,8	44	Somática
	MUC16	c.557C>T	p.Ser186Leu	0	0,256097561	21	Somática
	MUC19	c.7729G>A	p.Glu2577Lys	0	0,467811159	109	Somática
	NRAS	c.182A>G	p.Gln61Arg	0,007352941	0,423076923	44	Somática
	POTEE	c.487G>A	p.Asp163Asn	0	0,513157895	39	Somática
	RGS7	c.610-4C>G		0	0,205298013	31	Somática
	TMEM156	c.319G>A	p.Gly107Arg	0	0,378378378	14	Somática
	TNFAIP2	c.1797_1805del	p.Tyr600_Thr602del	0	0,382022472	34	Somática
	TXNDC2	c.832C>T	p.Pro278Ser	0,003460208	0,710280374	152	Somática
	USH2A	c.2729G>A	p.Gly910Glu	0	0,4	106	Somática
	ZFHX4	c.523G>A	p.Glu175Lys	0,005319149	0,609195402	106	Somática
12	IFT140	c.167C>T	p.Thr56Ile	0	0,379310345	33	Somática
	PTEN	c.302delT	p.Ile101Thrfs*12	0	0,830985915	59	Somática
	STAB1	c.5779C>T	p.Arg1927Cys	0	0,436734694	107	Somática

Nota. SP corresponde con muestra en sangre periférica y T** corresponde con muestra tumoral. Nuevamente se analizaron los casos de 1 a 12, exceptuando el caso 7, por lo que son 11 muestras en total.

En resumen, se identificaron mutaciones en genes implicados en la ruta MAPK en 7 de los 15 pacientes estudiados (47%) y en la ruta PI3K-AKT-mTOR en 4 de los mismos, lo que constituye un 27% del total de casos analizados molecularmente. Pormenorizando en los genes de la familia RAS, se identificaron mutaciones en KRAS en un 7% de los casos y en NRAS en el 13%, no identificándose ningún caso con mutaciones en HRAS; tampoco se identificaron mutaciones en BRAF. Al analizar el gen NF1 se identificó una frecuencia de mutaciones del 33,3%, de las cuales 2 (13%) eran deleciones parciales del mismo. La discrepancia existente entre el número de pacientes con mutaciones y el número de mutaciones se explica por la existencia de una comutación KRAS-NF1 en uno de los pacientes. Las mutaciones identificadas en elementos de la ruta PI3K-AKT-mTOR se distribuyeron en los genes PTEN y EIF4G3 de forma simétrica y en 3 de los 4 casos (75%) en coexistencia con mutaciones en elementos de la ruta MAPK.

Los datos relativos a la distribución muestral en base al número de mutaciones en la ruta MAPK y PI3K-AKT-mTOR se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13: Resumen de la frecuencia de mutaciones en la ruta MAPK y PI3K-AKT-mTOR.		N.º (%)
RAS		3 (20)
	NRAS	2 (13)
	KRAS	1 (7)
	HRAS	0 (0)
BRAF		0 (0)
NF1		5 (33)
	Mutación	3 (20)
	Delección	2 (13)
PTEN		2 (13)
EIF4G3		2 (13)

Se analizaron los niveles de expresión proteica de Ki67, pERK como marcador de actividad de la ruta MAPK y p-AKT como marcador de activación de la ruta PI3K-AKT-mTOR, datos que se detallan en la Tabla 14. La positividad de Ki67, pERK y p-AKT

abarcaba un rango de 5% a 40%, 0% a 90% y 0% al 60% respectivamente. La tinción IHQ de estos marcadores no se pudo correlacionar con las mutaciones en la ruta MAPK.

Tabla 14: Resumen de las variantes analizadas en cada caso y los niveles de expresión proteica en los efectores de la ruta.									
Caso	Gen	c.Hgvs	p.Hgvs	Frecuencia en ADN germinal	Frecuencia en ADN tumoral	MLPA NF1	p-ERK	Ki-67	p-AKT
1	NF1	c.4923G>A	p. Trp1641*	0	0,32731377	Wild-type	20%	40%	10%
2	NRAS	c.183A>T	p. Gln61His	0	0,435294118	Wild-type	40%	30%	30%
3	-	-	-	-	-	Wild-type	0%	15%	NV
4	CDKN2A	c.143C>T	p. Pro48Leu	0,053977273	0,413294798	Delección exones 31-58	50%	20%	50%
	APC	c.1186dupG	p. Asp396Glyfs*2	0,052050473	0,726190476				
	ATM	c.332G>A	p. Arg111Lys	0,041958042	0,779411765				
	NF1	-	-	-	-				
5	-	-	-	-	-	Wild-type	NV	NV	50%
6	-	-	-	-	-	Wild-type	50%	5%	50%
7	-	-	-	-	-	Wild-type	10%	25%	25%
8	NRAS	c.181C>A	p. Gln61Lys	0	0,313609467	Wild-type	1%	25%	60%
9	NF1	c.7395-1 G>A	-	0	0,303468208	Wild-type	60%	35%	10%
10	MITF	c.1255G>A	p. Glu419Lys	No disponible	0,561170213	Wild-type	90%	10%	25%
	FGFR1	c.1375G>T	p. Gly459Trp	No disponible	0,110320285				
	FGFR2	c.301A>G	p. Ile101Val	No disponible	0,876373626				
	KRAS	c.38G>A	p. Gly13Asp	No disponible	0,369565217				
	NF1	c.73dupA	p. Thr25Asnfs*13	No disponible	0,470967742				
	NF1	c.5371_5373del	p. Phe1791del	No disponible	0,203910615				
11*	-	-	-	-	-	Wild-type	70%	40%	20%
12*	-	-	-	-	-	Wild-type	0%	20%	0%
13*	NF1	-	-	-	-	Delección exones 15-40	20%	20%	50%
14*	-	-	-	-	-	Wild-type	0%	20%	60%
15*	-	-	-	-	-	Wild-type	30%	40%	10%

Nota. * Identifica mutaciones descritas como patogénicas o probablemente patogénicas por Vasome; NV corresponde a no valorable.

5.2.3.2 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

La SG media fue de 48 meses, con el 50% de los pacientes vivos a los 32 meses, con una SLE de 29 meses y medio (mediana de 12 meses) y una SEE media de 57 meses, con una mediana de 32 meses.

Se realizó un análisis bivariado para estudiar la posible relación de las diferentes variables cualitativas con la muerte por cualquier causa, la muerte específica por el tumor y la aparición de recidivas empleando el test de Fisher. Como se puede apreciar en la Tabla 15, la única variable estudiada que reflejó un impacto en la supervivencia de cualquier tipo fue la aparición o no de recidivas. No se identificó un impacto en la supervivencia de nuestra muestra del sexo, el estadio clínico al diagnóstico ni de la modalidad terapéutica empleada.

Al estudiar la posibilidad de que el comportamiento de la variable “número de recidivas” influyese en la variable “*exitus* de cualquier causa” se evidenció que, una vez rechazada la hipótesis de normalidad (test de Shapiro-Wilk ($p=0,001$ y $p=0,028$) y tamaño muestral reducido), no se pudo rechazar la hipótesis de que los promedios fueran iguales (test de Wilcoxon, $p=0,088$). Sin embargo, esta relación se torna estadísticamente significativa al analizar la influencia de la variable “número de recidivas” sobre la variable “*exitus* secundario al tumor” (test de Wilcoxon, $p=0,023$).

De forma similar se valoró la posibilidad de que el comportamiento de la variable “número de mutaciones” influyese en las diferentes curvas de supervivencia. Una vez rechazada la hipótesis de normalidad mediante el Test de Shapiro-Wilk, mediante el test de Wilcoxon no se pudo rechazar la hipótesis de que los promedios fueran iguales (SG: $p=0,659$; SLE: $p=0,690$; SEE: $p=0,938$) no pudiendo demostrar la existencia de diferencias en la supervivencia en función del número de mutaciones. Los datos relativos al análisis bivariado del impacto de las mutaciones en los diferentes elementos de la ruta de las MAPK en la supervivencias se detallan en la Tabla 16.

Tabla 15: Tabla de contingencia de la relación entre la SG, SEE y SLE con las diferentes variables cualitativas.									
Variable	SG			SEE			SLE		
	Exitus Sí N.º (%)	Exitus No N.º (%)	p	Muerte por tumor Sí N.º (%)	Muerte por tumor No N.º (%)	p	Recidiva Sí N.º (%)	Recidiva No N.º (%)	p
Hombre	5 (33)	2 (13)	1	4 (29)	3 (21)	1	4 (27)	3 (20)	1
Mujer	6 (40)	2 (13)		5 (36)	2 (14)		5 (33)	3 (20)	
T3	4 (27)	1 (67)	0,332	4 (29)	1 (7)	0,180	3 (20)	2 (13)	0,790
T4a	6 (40)	1 (7)		5 (36)	2 (14)		5 (33)	2 (13)	
T4b	1 (7)	2 (13)		0 (0)	2 (14)		1 (7)	2 (13)	
N0	10 (67)	3 (20)	0,476	8 (57)	4 (29)	1	8 (53)	5 (33)	1
N1	1 (7)	1 (7)		1 (7)	1 (7)		1 (7)	1 (7)	
Estadio III	3 (20)	1 (7)	0,238	3 (21)	1 (7)	0,232	3 (20)	1 (7)	0,630
Estadio IVa	7 (47)	1 (7)		6 (43)	2 (14)		5 (33)	3 (20)	
Estadio IVb	1 (7)	2 (13)		0 (0)	2 (14)		1 (7)	2 (13)	
Abierta	7 (47)	0 (0)	0,077	5 (36)	2 (14)	1	4 (27)	3 (20)	1
CENS	4 (27)	4 (27)		4 (29)	3 (21)		5 (33)	3 (20)	
RT	2 (13)	3 (20)	0,077	2 (14)	2 (14)	0,580	3 (20)	2 (13)	1
No RT	9 (60)	1 (7)		7 (50)	3 (21)		6 (40)	4 (27)	
Recidiva si	8 (53)	1 (7)	0,235	8 (57)	1 (7)	0,023	-	-	-
Recidiva no	3 (20)	3 (20)		1 (7)	4 (29)		-	-	
N+	3 (20)	1 (7)	1	3 (21)	1 (7)	1	-	-	-
N0	8 (53)	3 (20)		6 (43)	4 (29)		-	-	-
M1	6 (40)	4 (27)	0,231	5 (36)	0 (0)	0,086	-	-	-
M0	5 (33)	0 (0)		4 (29)	5 (36)		-	-	-

Tabla 16: Tabla de contingencia de la relación entre la SG, SEE y SLE con las diferentes mutaciones en los elementos de la ruta MAPK.

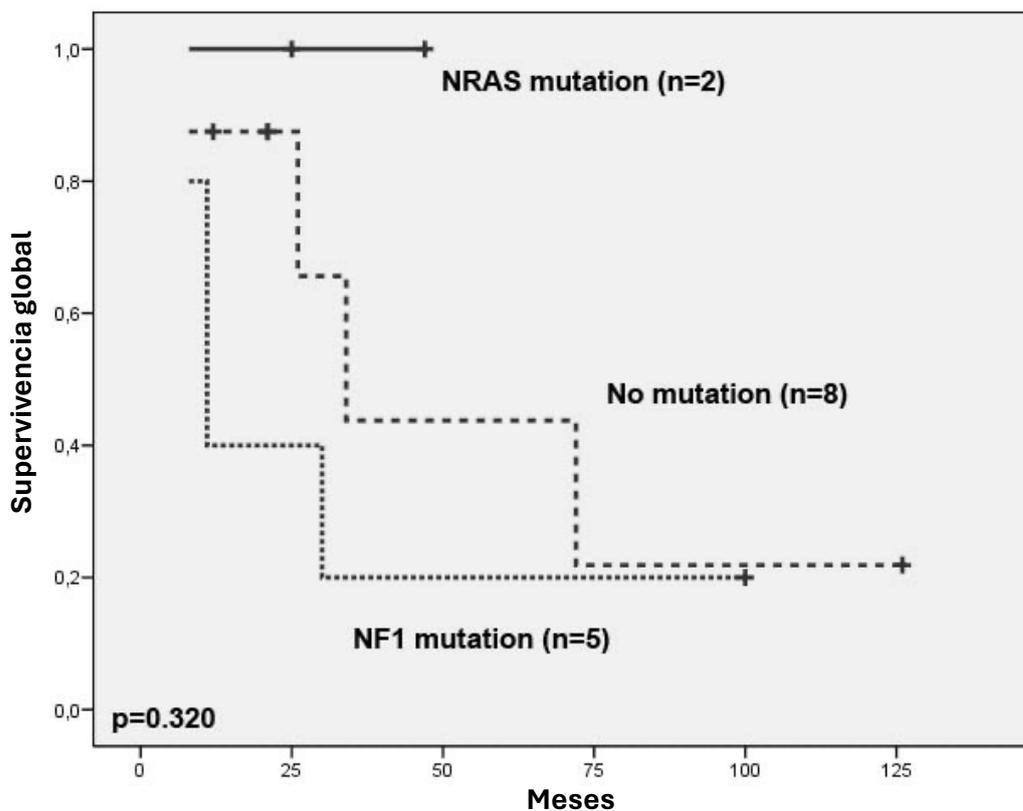
Variable	SG			SEE			SLE		
	Exitus Sí N.º (%)	Exitus No N.º (%)	p	Muerte por tumor Sí N.º (%)	Muerte por tumor No N.º (%)	p	Recidiva Sí N.º (%)	Recidiva No N.º (%)	p
KRAS <i>M</i>	0 (0)	1 (7)	0,267	0 (0)	1 (7)	0,400	0 (0)	1 (7)	0,302
KRAS <i>N</i>	11 (73)	3 (20)		9 (60)	5 (33)		7 (50)	6 (43)	
NRAS <i>M</i>	2 (13)	0 (0)	1	2 (13)	0 (0)	0,486	2 (14)	0 (0)	0,505
NRAS <i>N</i>	9 (60)	4 (27)		7 (47)	6 (40)		7 (50)	5 (36)	
NF1 <i>M</i>	2 (13)	1 (7)	1	1 (7)	2 (13)	0,525	1 (7)	1 (7)	1
NF1 <i>N</i>	9 (60)	3 (20)		8 (53)	4 (27)		8 (57)	4 (29)	
NF1 <i>D</i>	2 (13)	0 (0)	1	1 (7)	1 (7)	1	1 (7)	1 (7)	1
NF1 <i>N</i>	9 (60)	4 (27)		8 (53)	5 (33)		8 (57)	4 (29)	

Nota: *M* corresponde a Mutado; *N* a Nativo; y *D* a Delecionado.

Pese a ser conscientes de que la serie de 15 casos estudiada en este proyecto hacía imposible realizar un análisis de supervivencia que aportase conclusiones sólidas, se realizó un análisis preliminar, que se puede apreciar en la Figura 11, y que reflejó una tendencia hacia una peor SG en los 5 pacientes con alteraciones en NF1, mientras que los pacientes con mutaciones en NRAS mostraron una SG muy favorable.

Figura 11

Análisis Kaplan Meier de la SG en función del status mutacional de NRAS y NF1.



Por último, se valoró la posibilidad de que el grado de tinción IHQ de pERK y Ki67 tuviese un impacto en la supervivencia. La Figura 12 pretende ejemplificar los resultados del análisis IHQ empleado en 4 muestras con diferente estado mutacional de la ruta MAPK.

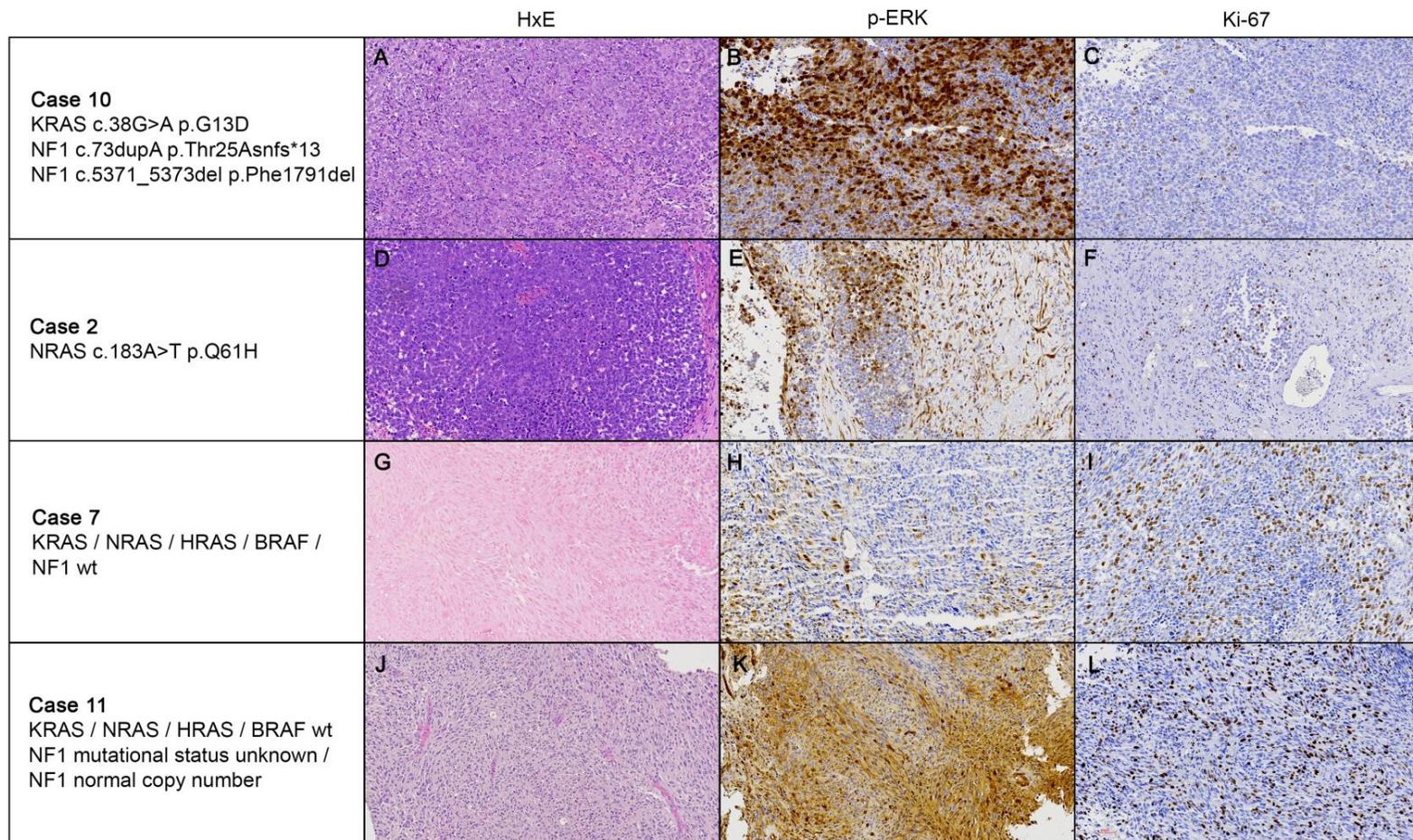
En el análisis de la relación de pERK con las variables “*exitus* por cualquier causa”, “*exitus* secundario al tumor” y “*recidiva*”, se rechazó la hipótesis de normalidad en todos los casos, tanto mediante el Test de Shapiro-Wilk como teniendo en cuenta el reducido

tamaño muestral. Tras analizar la hipótesis de que los promedios fueran iguales, mediante el test de Wilcoxon, se rechazó dicha hipótesis para la SG ($p=0,042$) demostrando la existencia de diferencias significativas en la SG en función del grado de tinción de pERK. Esta relación no se pudo demostrar, no obstante, ni para la SEE (test de Wilcoxon, $p=0,312$) ni para la SLE, en la que no se rechazó la hipótesis de igualdad de las dos varianzas poblacionales (test F de varianzas, $p= 0,242$), no pudiendo, por tanto, rechazar la hipótesis de igualdad de las dos medias poblacionales (test T de Student, $p=0,381$).

Al analizar la relación entre los resultados de la tinción de Ki67 con las variables estudiadas relativas a la supervivencia y una vez rechazada la hipótesis de normalidad, no se pudo demostrar que existiese una relación significativa con la SG (test de Wilcoxon, $p=0,303$) pero sí con la SEE (test de Wilcoxon, $p=0,027$) indicando una peor SEE cuanto mayor fuera el porcentaje de tinción IHQ para Ki67. En el estudio de la SLE, no se rechazó la hipótesis de igualdad de las dos varianzas poblacionales (test F de varianzas, $p= 0,779$), no pudiendo, por tanto, rechazar la hipótesis de igualdad de las dos medias poblacionales (test T de Student, $p=0,374$) no pudiendo demostrar la existencia de diferencias en la SLE en función de los valores de Ki67.

Figura 12

Relación entre el grado de tinción histológica e IHQ y el estatus mutacional de la ruta MAPK.



Nota. Se aprecia la heterogeneidad existente entre cuatro muestras sometidas a tinción con hematoxilina-eosina (HxE) e IHQ.

6. DISCUSIÓN

6.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los CNS, entre los que se encuentra el MMNS, son tumores que, pese a presentarse con una incidencia mayor en determinadas regiones geográficas, entre las que destaca Asturias, son muy infrecuentes.

Esta baja incidencia favorece que su estudio se limite, generalmente, al análisis retrospectivo de series pequeñas en centros especializados, en los que las guías de tratamiento se establecen *ad hoc*, en base a la experiencia de profesionales expertos más que en la evidencia científica disponible. Esta evidencia, por otra parte, es necesariamente limitada y carente del peso estadístico que permita obtener conclusiones robustas.

Esta ausencia de conocimiento y de guías de tratamiento generalmente aceptadas, han motivado que el MMNS se haya visto excluido, de forma prácticamente sistemática, de los ensayos clínicos con terapias dirigidas, de los que sí que se ha beneficiado el MC.

El reconocimiento y aceptación general de la naturaleza sistémica de esta enfermedad, unido a la ausencia de mejoría en su pronóstico a pesar de los avances en las diferentes modalidades de tratamiento, hacen que el perfil genético y molecular de estas lesiones sea la frontera que se debe franquear en el estudio de esta patología.

Consecuentemente, consideramos de importancia el conocimiento generado y aportado por este trabajo, tanto en esencia como sirviendo de punto de partida para proyectos venideros en la misma dirección.

6.2 ANÁLISIS CLÍNICO

Al analizar nuestra muestra desde un punto de vista epidemiológico, cabe destacar que esta se componía, de forma prácticamente exclusiva, por población occidental europea. Consecuentemente, consideraciones con respecto a raza y etnia, que han sido reconocidas como factores de riesgo en MMCC^{56,127,143}, no pudieron ser evaluadas.

En cuanto a su distribución demográfica, el MMNS no tiende a manifestar una predilección en cuanto al sexo, si bien en nuestra muestra, la proporción de pacientes mujeres, fue ligeramente superior (54%). Este hallazgo puede ser anecdótico dado que corresponde a variaciones en un pequeño número de pacientes. Sin embargo, la predilección por el sexo femenino es un hallazgo frecuentemente descrito en los MM^{127,144,145}, principalmente a consecuencia de la mayor incidencia de MMVV, sin haberse podido precisar el porqué de esta distribución diferencial⁷. Asimismo, se ha objetivado un incremento en la incidencia del MMNS que sí ha manifestado un impacto diferencial entre ambos sexos, doblándose o incluso triplicándose en mujeres con respecto a hombres^{75,146} sin que se hayan podido clarificar tampoco las causas de dicho incremento.

La edad media al diagnóstico en nuestra muestra fue de 74 años, comparable con lo descrito en la literatura médica¹⁸⁻²⁰ con un rango que abarcaba de los 49 a los 96 años, habiéndose descrito en prácticamente todos los grupos etarios¹⁴⁷.

En nuestra muestra, los factores demográficos analizados no demostraron tener un impacto en la supervivencia de ningún tipo. Esto contrasta con ciertos estudios en los que se apreció un impacto de la edad, de forma independiente, en la SG, tanto en MMCC^{15,124} como en MMNS^{24,132}.

Desde un punto de vista etiopatogénico, no se han descrito lesiones precursoras para el MMNS, aun habiéndose descrito cierta asociación con la melanosis nasosinusal⁴. Se considera que estas neoplasias pueden desarrollarse tanto a partir de cualquier lesión

melanocítica benigna²⁶ como a partir de melanocitos *de novo*³⁹. No existe evidencia definitiva de que los carcinógenos comunes como el tabaco o el alcohol, ni los virus carcinogénicos como el virus del papiloma humano o los virus herpes, desempeñen rol alguno en su patogenia¹⁴ así como tampoco se ha logrado relacionar con exposiciones ocupacionales tales como el polvo de madera o residuos de la industria textil, tan consistentemente relacionados con otros tipos de CNS.

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en los cuatro pilares fundamentales del diagnóstico moderno: la historia clínica, la exploración física, las pruebas de imagen y los estudios anatomopatológicos.

La epistaxis y la insuficiencia respiratoria nasal fueron las manifestaciones clínicas que motivaron el acudir a consulta para una primera valoración al 73% de nuestra muestra. Al realizar la exploración rinoscópica y nasofibros cópica, la localización más frecuente de dichas lesiones fue la fosa nasal (74% de los casos). Entre aquellos tumores que se presentaron en los senos paranasales, el seno maxilar y el etmoides fueron el lugar de asiento para el 83% de los casos.

Esta similitud clínica con la patología nasosinusal benigna, conjugada con su localización oculta son, en gran medida, responsables del retraso diagnóstico característicamente asociado a esta patología^{4,16,17,32,33,120}.

Las manifestaciones más distintivas de la patología nasosinusal maligna (proptosis, diplopía, dolor...) suelen traducir una enfermedad localmente avanzada con afectación de estructuras vitales circundantes. Si bien es cierto que los 2 pacientes que manifestaron clínica oftalmológica en el debut (diplopía y parestesias oculares) presentaban estadios IVb al diagnóstico, otros 4 pacientes que se diagnosticaron en estadio IVb presentaban epistaxis e insuficiencia respiratoria nasal como motivo de consulta. Se apreció que, si bien el estadio no se relaciona con un perfil de manifestaciones clínicas concretas, la presencia de ciertas manifestaciones como las oftalmológicas y las neurológicas sí sugeriría un estadio localmente avanzado. Sin embargo, al analizar el impacto de la clínica de presentación en el devenir de la

enfermedad, no pudimos demostrar la existencia de diferencias significativas en términos de supervivencia.

En nuestra muestra no pudimos esclarecer el impacto pronóstico de la localización primaria del tumor ni de su aspecto macroscópico, que sí se ha establecido en ciertas series.

En este sentido, se ha descrito que la localización primaria de estos tumores tiene una implicación pronóstica reconocida superior al propio tamaño tumoral^{51,124,148,149} y que, la localización en el territorio de cabeza y cuello implica un riesgo independiente de progresión frente al conjunto de los MM¹²⁷. Dentro de este subgrupo, los MMNS y particularmente aquellos originados en los senos paranasales, comprenden los tumores de peor pronóstico, con menores SG y SLE en comparación con los de origen en la cavidad nasal u oral^{24,124,130-132}.

Al examen macroscópico, únicamente el 8% de los melanomas de nuestra muestra fueron descritos como amelanóticos, frente a series que describen esta característica en hasta un 70% de los casos⁸. Dicha ausencia de pigmentación melánica, si bien constituye otro factor macroscópico que dificulta el diagnóstico clínico, también se ha relacionado con una biología más agresiva^{76,102,128,129}. Sin embargo, el porcentaje tan elevado de casos perdidos en esta magnitud no nos permitió replicar ni negar de una forma consistente los hallazgos de otras series mayores.

Siendo preceptiva la realización de una prueba de imagen seccional, en nuestra muestra se realizó en todos los casos un TC facial con contraste intravenoso, tanto por su disponibilidad como por su excelente correlación anatómica para la planificación del tratamiento quirúrgico.

No obstante, la mayor parte de las series consideran la RM como el método diagnóstico por imagen de elección^{12,35,36} en base a que el análisis de señal en las diferentes secuencias proporciona un patrón de información muy sofisticado que, combinado con la gran resolución espacial y contraste, permite una mejor delimitación

de la extensión en profundidad del tumor. En nuestra muestra, dicho estudio, fue reservado para aquellos casos en los que se consideró necesaria una valoración más precisa de la afectación de estructuras críticas, como en casos de afectación orbitaria o intracraneal.

La tecnología PET, tanto en combinación con TC como con RM, todavía se encuentra en fase de consolidación en el diagnóstico y estadificación del MMNS, con resultados muy favorables, lo que lo convierte en una prometedora perspectiva futura. Si bien, la combinación con TC ya ha demostrado una excelente correlación anatomopatológica³⁸ su combinación con RM no ha demostrado inferioridad en la estadificación inicial de los tumores de cabeza y cuello³⁶ proporcionando una mejor diferenciación tisular y valoración de la extensión perineural, con una valoración similar de las estructuras óseas¹⁵⁰.

La confirmación diagnóstica la proporciona el análisis anatomopatológico, tanto histológico como IHQ, constituyendo el principal criterio de inclusión en la selección de nuestra muestra. Sin embargo, la histología del MM es, en general, superponible a la de su equivalente cutáneo^{8,38,39}, lo cual puede suponer un desafío diagnóstico y obliga a descartar la posibilidad de que nos encontremos ante una metástasis mucosa de un melanoma originado en otra localización anatómica, tratándose este último de un evento mucho más frecuente. Si bien existen ciertos patrones, tanto histológicos (células fusiformes) como IHQ (elevada expresión de PNL2 y Ki67)³⁹, que sugieren que nos hallamos ante una MM frente a una metástasis de MC, estos distan de ser suficientemente conclusivos como para establecer el diagnóstico con seguridad. Esta dificultad intrínseca para establecer el diagnóstico diferencial motivó que todos aquellos pacientes con antecedentes de MC fueran excluidos de nuestro estudio.

La inmunotinción de los MM se caracteriza por la ausencia de respuestas consistentes a la tinción con un marcador concreto, de forma diferencial con el MC³⁹ y establece la necesidad de un panel amplio con múltiples marcadores⁴⁰.

El marcador más frecuentemente positivo en nuestra muestra, el S-100, se caracteriza por una buena sensibilidad para el MMNS¹⁵¹ con inferior especificidad⁸. El segundo marcador más utilizado en nuestra muestra, los anticuerpos anti HMB45, se unen de forma dispersa en las células melánicas pero no han demostrado capacidad para distinguir entre lesiones benignas y malignas^{39,152}. Este es el marcador más sensible para el melanoma¹³, con buena especificidad diagnóstica^{151,153} y resulta especialmente útil en el diagnóstico de melanomas amelanóticos.

Si bien en el MC, la afectación de los ganglios linfáticos regionales constituye el principal factor pronóstico, en el MMCC el significado clínico de la detección de un ganglio linfático positivo para malignidad es incierto¹⁴. Consecuentemente, una biopsia de ganglio linfático centinela positiva no necesariamente implicaría una disección ganglionar cervical, ya que no existe evidencia que sugiera que confiere un beneficio en la supervivencia³⁰. En consecuencia este procedimiento no se plantea de forma rutinaria en los MMNS y no se realizó en nuestros pacientes.

En nuestra muestra, cerca del 70% de los pacientes se presentaron con un estadio IV al diagnóstico, el 46% del total como estadios IVa y el 23% como estadios IVb, similar a los resultados publicados por Koivunen et al.⁵¹ y Shuman et al.⁵². Los estadios avanzados de nuestra serie fueron debidos en mayor medida a la extensión local del tumor primario, más que a la presencia de metástasis ganglionares (15%) o a distancia (4%). El 35% de los pacientes se presentaron con un tumor delimitado a su localización primaria (T3), frente a un 65% con tumores localmente avanzados, de los cuales el 23% eran categorizados como T4b. Este patrón de presentación como enfermedad localizada es consistente con series más amplias de MMNS publicadas³⁹.

En el 100% de nuestros pacientes con tumores localizados (T3), este se encontraba en la fosa nasal, mientras que en el 33% de los T4b lo hacían en los senos paranasales. Dichos hallazgos sugieren que, el perjuicio ocasionado por la localización oculta, podría tener un mayor impacto en el pronóstico que el ocasionado por la proximidad a estructuras vitales o críticas.

Las metástasis ganglionares locorregionales, presentes en el 15% de nuestra muestra al diagnóstico, son un hallazgo relativamente frecuente en todos los tipos de MM, con ciertas variaciones en función de la localización concreta del tumor primario (20% para el MMCC frente a menos del 10% en el MMNS⁴⁸).

Solamente uno de nuestros pacientes debutó con metástasis a distancia, pese a ser un evento descrito con relativa frecuencia (5-10%) en los MMCC⁴⁸. No obstante, cerca del 25% de nuestra muestra, las desarrollaría durante el seguimiento. El patrón de distribución de dichas metástasis siguió el descrito en la literatura médica, siendo las principales dianas el pulmón y el hígado. Llamativamente el 83% de los pacientes manifestaron una afectación metastásica múltiple, muy superior al 33% publicado por Bartell et al.⁴⁸, pero en ningún caso se demostró la existencia de tumores metacrónicos, hallazgo que, en la serie sin precedentes publicada por Penel et al.⁹⁵, se identificó hasta en un 15%.

Este comportamiento evolutivo, contrastado en diferentes series de pacientes, sostienen el cambio de paradigma que busca considerar esta enfermedad, desde su diagnóstico, como una condición sistémica.

Sin embargo, este paradigma no se ha podido reflejar, por el momento, en las guías terapéuticas empleadas en el manejo de esta enfermedad. La última actualización (Versión 1.2021) de las guías de la *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*¹⁵⁴ para el MMNS recomienda: para el tratamiento de las categorías T3 y T4a con metástasis cervicales clínicamente negativas, la resección quirúrgica asociada a RT adyuvante (sugieren considerarlo en T3 y aplicarlo en T4a) asociado o no a la adición de un tratamiento sistémico (recomendación categoría 2B); para el tratamiento de los pacientes con tumores incluidos en las categorías T3 y T4a con metástasis ganglionares clínicas, el tratamiento de elección es la resección quirúrgica del tumor primario y el vaciamiento ganglionar ipsilateral asociado a RT adyuvante, tanto del lecho quirúrgico como del cuello, valorando la adición de un tratamiento sistémico (recomendación categoría 2B); para el manejo de los pacientes con tumores incluidos en las categorías T4b se recomienda, como primera modalidad de tratamiento, la RT radical o las terapias

sistémicas, poniendo al mismo nivel en los pacientes con metástasis ganglionares clínicas, el tratamiento de soporte; por último para el manejo de la enfermedad recurrente o persistente, la recomendación proporcionada consiste en atenerse a las guías NCCN para el MC.

Esta guía es un reflejo de la controversia que existe entre el conocimiento de la naturaleza sistémica de esta enfermedad y la consecuente necesidad de una terapia sistémica efectiva frente a la ausencia de resultados favorables en términos de supervivencia con las terapias ensayadas hasta la fecha.

En nuestra serie el 92% de los pacientes recibieron tratamiento quirúrgico como primera modalidad terapéutica, el 63% de ellos por vía endoscópica mediante CENS. Este es el modo de actuación general de las diferentes series publicadas ya que se considera que, siempre que sea técnicamente factible, la resección quirúrgica completa es el tratamiento que proporciona los mejores resultados en términos de SLE y SG¹¹.

El abordaje mediante CENS se asoció, en nuestra serie, a una mayor SG frente a los abordajes abiertos ($p=0,045$), de forma similar a lo identificado por otros autores^{90-92,155}. Pese a que no pudimos identificar estas diferencias significativas en lo relativo a la SEE ni a la SLE, numerosos estudios han demostrado la no inferioridad en estos términos frente a abordajes abiertos^{21,82-84,92,156,157}.

Esto se ha demostrado como estable una vez eliminado el sesgo de selección, que es defecto natural de este tipo de comparaciones. Si bien históricamente existía una tendencia a emplear el abordaje endoscópico únicamente en el tratamiento de tumores seleccionados de pequeño tamaño y realizado por cirujanos expertos con intención curativa, progresivamente dicho abordaje se ha ido estableciendo como el tratamiento de elección en todos los casos. Esta situación es la que caracteriza nuestra serie, en la cual a partir de 2014 todos los casos fueron tratados con abordajes endoscópicos, sin perjuicio de los resultados oncológicos. Esto refleja la curva de aprendizaje de la técnica, que ha permitido a los cirujanos expertos alcanzar resecciones satisfactorias por vía endoscópica.

Este abordaje es muy superior en términos de calidad de vida, habiéndose demostrado un menor nivel de dolor postoperatorio, una hospitalización más breve y un beneficio cosmético incomparable¹⁵⁸ frente a los abordajes abiertos, con una incidencia similar de complicaciones⁸⁹.

Asimismo, el abordaje endoscópico mantiene los buenos resultados en el tratamiento de rescate tras recidivas o recurrencias^{34,158} y permite, con mínima morbilidad, el control de ciertos síntomas refractarios en situaciones de manejo paliativo³⁰.

Únicamente en un 35% de nuestra serie, se empleó la RT en alguna de sus formas y en alguna de las fases del tratamiento: solamente un paciente recibió tratamiento con RT con intención radical, frente a 4 pacientes que recibieron RT adyuvante y otros 4 que la recibieron con intencionalidad paliativa, para el control de síntomas refractarios.

La RT con intencionalidad radical, actualmente se limita a pacientes con enfermedad locorregional irresecable y/o inoperable. La radiorresistencia intrínseca del MMNS y su naturaleza sistémica hace que, pese a que la RT convencional pueda alcanzar cierto control local, no se considere suficiente para controlar la enfermedad en su totalidad^{93,94} y que, de forma general, se equipare a no recibir tratamiento en cuanto al riesgo de muerte⁹³.

Pese a que existen resultados consistentes en cuanto a que la RT adyuvante mejora el control local^{34,98,101,159} el impacto de dicho control local en la SG continúa en entredicho. La evidencia científica se encuentra dividida, existiendo numerosos autores que defienden una relación significativa entre la RT y la LCR con la SG^{34,98,101,159,160} y que se ven respaldados en último término por los metaanálisis realizados por Hu et al.¹⁶¹ en 2018 y por Grant-Freemantle et al.¹⁶² en 2021. Por oposición, existen numerosos estudios que niegan dicha correlación^{11,99,124,163} y que se encuentran respaldados en último término por las revisiones realizadas por Crippen et al.⁸³ en 2018 y Ganti et al.¹¹⁵ en 2019.

Esta ausencia de correlación entre el LCR y la SG podría explicarse por los patrones de recurrencia del MMNS. Como se aprecia en el análisis de nuestra serie, la tasa de recurrencia o recidiva local es inferior a la tasa de desarrollo de metástasis a distancia, que fue del 25% en nuestra serie independientemente de haber alcanzado un satisfactorio control local tras la cirugía. Este hecho se ha descrito hasta en el 50% de los casos en determinadas series^{15,34} y se presenta de forma independiente a la administración de RT adyuvante. Esto plantea una duda sobre el impacto del tratamiento local y, sobre todo, de su intensificación^{83,110} en el control de esta enfermedad.

En la misma línea y de forma consecuente, una intensificación del tratamiento sobre el cuello no necesariamente asociará un impacto real en la supervivencia de estos pacientes.

En nuestra muestra únicamente en 2 pacientes (algo inferior al 8% del total) se realizó un vaciamiento ganglionar en el primer tiempo quirúrgico, en ambos casos por la existencia de metástasis clínicas y optando en ambos casos por un VGF bilateral. En ningún caso se realizó un vaciamiento ganglionar electivo en cuellos cNO.

En el MMNS, no se han demostrado diferencias en términos de supervivencia a incluir un vaciamiento ganglionar en el plan de tratamiento primario^{115,164} por lo que la mayor parte de los autores no lo indican en el manejo del cuello cNO^{11,100,128,165}.

Dos pacientes fueron tratados con un VGF bilateral como rescate tras el fracaso regional. Sin embargo, pese a que el vaciamiento ganglionar terapéutico está indicado con el objetivo del control local y tratamiento sintomático, tampoco existe evidencia clara que demuestre que esta medida se traduzca en un beneficio en la SG^{39,115}. Nuestros 2 pacientes sufrieron una recaída a nivel local y uno de ellos desarrolló metástasis a distancia, falleciendo ambos como consecuencia del tumor tras una SG media de 99 meses.

La tendencia actual, en definitiva, se inclina hacia un enfoque conservador en el manejo del cuello, tanto en la indicación de tratar o no¹²¹ como a la hora de limitar la extensión de dicho tratamiento¹⁶⁴.

Pese a la imperiosa y demostrada necesidad de ellas, no existen guías de consenso sobre el tratamiento sistémico óptimo para el MM. La mayor parte de los datos a este respecto provienen de informes de casos y estudios con un número muy limitado de pacientes y, en consecuencia, los regímenes empleados dependen de la extrapolación de las terapias utilizadas en el MC avanzado¹⁴. En nuestra serie, el empleo de terapias sistémicas fue marginal, administrándose bioquimioterapia únicamente a un 9% de los pacientes, mientras que en ningún caso se realizó tratamiento con terapias dirigidas ni inmunoterapia.

Los beneficios de la QT adyuvante en el MM son poco claros y ninguna terapia ha demostrado un beneficio en la supervivencia en general^{111,166} ni en el MMCC en particular³⁰. Al comparar los efectos de la QT frente a la bioquimioterapia, el impacto real es dudoso, con autores que otorgan superioridad a la última¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ frente otros que no aprecian diferencias¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Se ha hipotetizado, que la neoadyuvancia con QT o quimiorradioterapia (QRT) en el MMNS podría reducir la presencia de células tumorales circulantes y micrometástasis, dada la gran vascularización de estas áreas y la fragmentación tumoral asociada a las técnicas *piecemeal* empleadas con frecuencia en la CENS¹⁷⁰. Por desgracia, la literatura existente sobre los beneficios de la bioquimioterapia neoadyuvante en el MMNS es muy escasa. Si bien los resultados publicados por Hafström et al.¹¹⁰ en 2019 identificaron una SG a los 5 años del 70% y una SLE del 90%, lo cual resultaba muy prometedor, Amit et al.¹³⁰ en 2017 analizaron 152 pacientes con MMNS en cuatro grupos en función del si el tratamiento se había realizado con cirugía solo, cirugía con RT adyuvante, cirugía con QRT adyuvante y cirugía con bioquimioterapia neoadyuvante sin poder identificar beneficios significativos del tratamiento con bioquimioterapia. Estos resultados son similares a los reflejados por Yao et al.¹⁰⁹ en su estudio fase II.

En adyuvancia al tratamiento RT, tanto Takayasu et al.¹⁷¹ como Koto et al.¹⁷² en el estudio J-CROS, evaluaron la eficacia de la terapia con iones de carbono combinada con QT, obteniendo una LCR mayor del 90% a los 3 años con una SG cercana al 50% y una más que aceptable tasas de efectos secundarios.

Tras finalizar el seguimiento, la SG de nuestra muestra fue del 77% al año, pero del 31% a los 3 años con una mediana de supervivencia de 29 meses tras el primer tratamiento. Este mal pronóstico con SG a los 5 años inferiores al 25% se mantiene para todas las variantes del MM^{6,8,25}, independientemente de la radicalidad del tratamiento aplicado y la adyuvancia administrada¹⁵. La SEE identificada en nuestra muestra fue del 86% al año y del 43% a los 3 años con una mediana de 34 meses desde el primer tratamiento.

La SLE de nuestra muestra fue del 62% al año y del 23% a los 3 años con una mediana de tiempo libre de enfermedad de 13 meses y una tasa de recidiva del 74%, algo superior a las descritas para MMNS⁸. La afectación ganglionar metastásica, que se ha identificado como factor de riesgo independiente tanto en MM en general^{127,144}, como en MMCC¹²⁴ y MMNS en particular¹⁷, no demostró asociarse a un impacto en la supervivencia en nuestra serie. La tasa de metástasis a distancia en nuestra muestra fue del 26%, ligeramente inferior a los resultados publicados en determinadas series^{17,82,122} en las que correlacionan este evento con peores SG y SEE¹⁷³, lo cual no se pudo replicar en nuestra serie.

Estos resultados de supervivencia, se encuentran en la línea de los resultados del proyecto *RARECAREnet* (red de información de cánceres raros) que evidenció una SG estimada a los 5 años del 20%, estable desde hace más de 20 años^{7,15}, con una media de supervivencia de 49 meses¹³¹ y una SLE a los 5 años del 44%¹⁷ con una tiempo medio a la recidiva de 22 meses¹³¹.

Los resultados descritos y analizados permiten considerar la serie estudiada como representativa de la población general de pacientes con MMNS, descrita en series de mayor tamaño.

6.3 ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR

6.3.1 RUTA DE LAS MAPK

En los 15 MMNS que componen nuestra serie y fueron sometidos a un estudio genético no se identificó ninguna mutación en KIT ni BRAF mientras que en RAS y NF1 se detectaron en un 20% y un 33% de los casos, respectivamente.

Las mutaciones en NF1, de acuerdo con la clasificación propuesta por el TCGA⁶⁹ para el MC, definen el subtipo genético NF1 mutado. En nuestra serie, 5 de los 15 pacientes que se sometieron al estudio genético (33%) demostraron albergar alguna mutación en este gen. Este porcentaje es muy superior al descrito en la literatura médica, tanto para el MC como para el MM en sus diferentes localizaciones⁷⁸ y en particular en el MMNS¹⁷⁴, que es de en torno a un 15%.

Un hallazgo destacable de nuestro estudio fue que, además de los 3 casos con mutaciones inactivadoras, identificamos 2 tumores que albergaban pérdidas intragénicas de varios exones de NF1, ocasionando la inactivación del gen. En uno de los dos casos pudimos realizar la cosecuenciación con la línea germinal pudiendo demostrar que la alteración era somática y con un genotipo homocigoto.

Hasta la fecha, no existen registros en la literatura médica con respecto a la existencia de deleciones intragénicas, parciales o exónicas como causa de melanoma, estando bien descrito para los casos de deleciones groseras que incluyen todo el gen NF1^{18,32,45,57,58,75,76,78,175-183}.

Esto probablemente es debido a las técnicas genéticas empleadas habitualmente: la secuenciación Sanger proporciona información sobre las mutaciones, pero no sobre el número de copias del gen, mientras que la secuenciación mediante panel de genes, que se aplica sobre un número reducido de genes y sin cosecuenciación de la línea germinal, no genera información sobre el número de copias.

Las deleciones intragénicas y duplicaciones del gen NF1 sí que han sido descritas en la línea germinal de pacientes con neurofibromatosis tipo 1, afectando a diferentes exones del gen^{57,68,184-187}. En cuanto al mecanismo mediante el cual se desarrollan estas deleciones, Hsiao et al.⁶⁸ identificaron que las alteraciones intragénicas en la línea germinal de NF1 variaban en tamaño, localización y mecanismo de reordenamiento, sugiriendo un mecanismo que implicaba un bloqueo de la hélice y cambio de plantilla (FoSTeS, procedente de *fork stalling and template switching*) y la replicación mediada por la microhomología (MMBIR, procedente de *microhomology-mediated break-induced replication*). Sin embargo, no está claro que las deleciones somáticas intragénicas identificadas en nuestro estudio se desarrollen de la misma forma o bien reflejen reordenamientos cromosómicos.

El análisis exhaustivo de mutaciones en el gen NF1 entraña una gran complejidad: si bien aproximadamente un 5-10% de las mutaciones en NF1 heredables implican alteraciones groseras del ADN (principalmente deleciones genómicas que abarcan todo el gen y la región que lo flanquea así como reordenamientos intragénicos de varios exones⁵⁷), la mayoría de las mutaciones (85-90%) son alteraciones pequeñas, como la sustitución de una sola base, inserciones o deleciones⁶⁶. Cerca del 30% de estas mutaciones ocasionan una alteración en el reordenamiento. Esto unido a que las mutaciones de empalme (*splicing*), que pueden identificarse en más del 20% de los individuos con NF1, pueden estar localizadas profundamente en los intrones y no identificarse cuando se estudian únicamente los exones⁶³ hace necesario un análisis tanto del ADN como del ARN. A esto debe sumársele un problema para establecer la significación clínica de las mutaciones *missense* y una amplia distribución espacial de las microdeleciones de NF1 influidas por las repeticiones de pocas copias alrededor de la región 17q11.2⁵⁷.

En cuanto al impacto clínico de la presencia de dichas mutaciones inactivadoras en NF1, nuestros resultados reflejan una tendencia hacia una SG desfavorable (Figura 11) en este subgrupo de pacientes. Si bien Cirenajwis et al.¹⁷⁶ defienden esta tendencia pronóstica, la generalidad de la literatura médica no ha podido corroborar el impacto de estas mutaciones en la supervivencia ni en la tendencia al fracaso terapéutico^{18,75}.

En el MC, el subtipo NF1 mutado, se considera una entidad biológicamente diferente, con una correlación más fuerte con la mutagénesis inducida por radiación UV y una carga mutacional superior. En general, se considera que la radiación UV no juega un papel en la patogénesis del MM, pero en el estudio publicado por Newell et al.¹⁸² se defiende que esto puede ser considerado cierto para los MM de la mitad inferior del cuerpo pero no para todos los que se originan en el área de cabeza y cuello. No obstante, se considera improbable que la radiación UV esté implicada en las deleciones parciales somáticas de NF1.

El status NF1 tiene asimismo potencial para comportarse como un marcador de respuesta para inmunoterapia, por su asociación con una alta carga mutacional^{176,182,183}.

En cuanto al subtipo molecular RAS mutado, el 20% de los casos analizados en nuestra muestra demostraron albergar una mutación activadora en un miembro de la familia RAS (13% en NRAS, 7% en KRAS y 0% en HRAS), de forma similar a los resultados publicados por Cosgarea et al.⁷⁸. Las mutaciones en NRAS identificadas se localizaban en los locus Q61H y Q61K mientras que la única mutación en KRAS se hallaba en el locus G13D. Tanto la frecuencia de dichas mutaciones como su localización concuerdan con la literatura médica existente.

Las mutaciones en NRAS han sido descritas en el 30% de los MC⁶⁹ y en un porcentaje ligeramente inferior en el MM (10-20%)^{25,29,45,73,74,174}. No obstante, el MMNS presenta una incidencia de mutaciones algo superior (14-30%)^{18,42,45,75-77,188} que lo equipara al MC.

El 98% de dichas mutaciones son activables y dirigidas, principalmente, al locus Q61: Q61R (40%), Q61K (32%), Q61L (13%) y Q61H (5%) como refleja nuestra serie. Esta alta frecuencia de mutaciones en el codón 61 de NRAS se ha relacionado con la presencia de fotoproductos de ADN inducidos por radiación UV, que tienden a acumularse alrededor del codón 61 en las células humanas irradiadas⁴². Si bien no se considera que la radiación UV juegue un papel en la patogénesis del MMNS, esta fue la firma genética identificada en nuestra muestra.

En la literatura médica, para la localización nasosinusal, la distribución de las mutaciones en NRAS se reparte de forma simétrica entre el exón 2 (codón 12 y 13) y el exón 3 (codón 61)^{15,42,45,56,73,74,189}. Sin embargo, nosotros no identificamos ninguna mutación en NRAS que afectase al exón 2.

Pese a que numerosos estudios^{18,75,77} han defendido que los elementos críticos de la ruta MAPK se regían por el principio canónico de las mutaciones con comportamiento mutuamente exclusivo, considerando que mutaciones adicionales no conferirían una ventaja selectiva, la mutación KRAS se identificó en comutación con NF1, siendo este el único caso en el que se apreció esta afectación de la ruta en más de un nivel crítico (7%). Nuestros resultados son superponibles a los obtenidos por Wroblewska et al.⁷⁶ en su serie.

El hecho de que la comutación se haya producido con NF1 entraña un interés adicional: el descubrimiento de ciertas mutaciones no canónicas con capacidad para activar o inactivar respectivamente a oncogenes o genes supresores de tumores de manera parcial motivó el análisis de los datos genómicos de la *Cancer Cell Line Encyclopedia* y el TCGA. Este análisis reveló que el 9,6% de los melanomas con mutaciones en NF1 la presentan en comutación con BRAF, RAS o RAF1. Sin embargo, mientras que las mutaciones canónicas en KRAS no ocurren con una frecuencia aumentada en el contexto de mutaciones en NF1, las mutaciones no canónicas de KRAS sí que lo hacen, sugiriendo que estos pares de mutaciones pueden actuar de forma conjunta para conferir una ventaja selectiva⁵⁷ consiguiendo una activación más intensa de la ruta MAPK¹⁷⁹.

En cuanto al impacto pronóstico de la mutación de un miembro de la familia RAS, en nuestra muestra no se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas, ni en la SG ni en la SEE o SLE, así como tampoco se demostraron al valorar el número total de mutaciones que albergaba cada muestra. Apreciamos que, sin alcanzar la significación estadística, los pacientes con mutaciones en NRAS presentaron una tendencia a una mayor SG (Figura 11). No obstante dicho hallazgo no ha sido

corroborado por el estudio publicado por Amit et al.¹⁸ en el que describen una ausencia de impacto en la supervivencia de las mutaciones en NRAS, BRAF y KIT.

El subtipo BRAF mutado es en el que se encuentra el principal punto de discrepancia con el análisis genético del MC, tanto en la incidencia como en el impacto terapéutico y pronóstico.

La incidencia de dichas mutaciones en nuestra serie fue del 0%. Si bien los resultados publicados en MMNS varían en su incidencia desde un 3-36%^{18,45,75,180} en el MC estas mutaciones se han descrito en un 50-70% de los casos^{56,69} frente al 10% descrito para el conjunto de los MM^{14,29,174}.

En el MC, dichas mutaciones se distribuyen un 90% en el locus V600, entre el V600E, V600K y V600R^{25,69}, definiendo la firma mutacional típica ocasionada por la fotoexposición a radiación UV.

Estas mutaciones han demostrado una gran capacidad para activar de forma intensa la ruta MAPK tanto en MC como en MM. No obstante, el impacto pronóstico de este tipo de mutaciones en el MMNS no está bien establecido. Si bien ciertos estudios han correlacionado su presencia con una peor supervivencia libre de progresión (SLP)²⁹, la existencia de moléculas terapéuticas aprobadas dirigidas a dicha mutación, convierte a estos pacientes en potenciales candidatos a una terapia dirigida que ya ha demostrado mejorías en la SG en MC^{25,190}.

El porcentaje de MMNS triple-negativos descritos en nuestra serie fue del 53%, muy superior al descrito para los MC que es de en torno al 15%¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. En nuestra serie, el perfil mutacional característico de dicho subtipo no demostró ejercer un impacto significativo en la supervivencia.

En conjunto, nuestros resultados son concordantes con la literatura médica disponible sobre series de pacientes, en las que la secuenciación de genoma completo y la WES han permitido profundizar en el conocimiento de las rutas moleculares y las

posibles dianas terapéuticas. En ellas se demuestra la existencia de mutaciones en la ruta MAPK en el 50-90% de los MM pero con una distribución diferencial con respecto al MC en cuanto a los genes afectados: en el 6% de los casos se han descrito mutaciones en BRAF (rango 0-32%), en el 20% en NRAS (rango 5-41%) y en el 15% en NF1 (rango 4-37%), mientras que las mutaciones en KIT, SF3B1 y SPRED se observaron en un 15% aproximadamente (rango 3-47%)^{18,32,45,75,76,78,175,176,178,180,181}. Esta tasa de mutaciones, inferior a la observada en el MC, es comparable con la identificada en otros tumores no asociados a la exposición a mutágenos conocidos, que se caracterizan por una gran inestabilidad genómica manifestada en forma de variantes estructurales, amplificaciones y deleciones²⁵.

El estudio IHQ, dirigido a valorar la relación entre los marcadores y el estado de activación de la ruta MAPK, no permitió demostrar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la expresión del efector de la ruta (pERK) o el índice de proliferación celular (Ki67) y el estatus mutacional de la misma. Si bien estos datos ya habían sido apreciados en estudios sobre el MC¹⁹¹ no habían sido refrendados en estudios sobre el MMNS. Estos resultados implicarían que el estudio genético de estos tumores no puede ser sustituido por el análisis IHQ a la hora de identificar sus posibles dianas terapéuticas.

Sin embargo, nuestros resultados sugieren una potencial implicación pronóstica de estos marcadores: si bien su grado de tinción no se correlacionó de forma consistente con la supervivencia, sí pudimos poner de manifiesto una relación estadísticamente significativa entre el grado de tinción de pERK, (directamente proporcional al grado de expresión de la ruta MAPK), con la SG ($p=0,042$). Esta relación, si bien había sido estudiada en el MMNS⁴⁵, había sido descartada como marcador pronóstico¹⁹¹; por otra parte, pudimos establecer una relación significativa entre la tasa de expresión de Ki67 y la SEE de nuestra muestra ($p=0,027$). Este marcador se ha empleado como índice pronóstico en gran número de neoplasias malignas humanas, fundamentalmente en cáncer de mama¹⁹² y de cervix^{193,194}, y de forma reciente, en el MMCC^{195,196} y en el MMNS^{43,44}.

Nuestros resultados, por tanto sugieren que, si bien estos marcadores IHQ no permiten por sí mismos predecir el estatus mutacional de la vía, sí podrían traducir una implicación pronóstica que permitiera una estimación y asesoramiento más preciso del riesgo y de la necesidad de intensificar o no el tratamiento.

6.3.2 RUTA PI3K-AKT-mTOR

En nuestra serie, el análisis genético, identificó la presencia de mutaciones probablemente patogénicas que afectaban a elementos críticos de la ruta PI3K-AKT-mTOR en el 27% de los casos. Estas 4 mutaciones se distribuyeron en 2 genes: PTEN y EIF4G3. Llamativamente, en 3 de los 4 casos, se detectaron en comutación con la ruta MAPK (concretamente con NRAS).

Llama la atención, comparativamente, que series como la publicada por Turri-Zanoni et al.⁴⁵ identificaran un déficit en la expresión de PTEN en un 50% de los MMNS analizados, frente al 18% de alteraciones identificada en nuestra muestra. Los estudios como el nuestro, que buscan identificar las mutaciones en PTEN, tienden a infraestimar el grado de afectación de la ruta debido a que únicamente una pequeña proporción de los tumores con una expresión reducida de PTEN la presentan secundaria a mutaciones inactivadoras identificables. En la mayor parte de los casos, la pérdida de expresión es secundaria a deleciones genómicas y a procesos de silenciamiento transcripcional o epigenético^{56,197}.

Identificamos adicionalmente una mutación potencialmente patogénica en el gen EIF4G3 (*eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3*) en 2 casos. Este gen, que codifica para un componente accesorio de la ruta PI3K-AKT-mTOR, no se había descrito previamente como implicado en la patogénesis del MMNS y, solo recientemente, se ha asociado a un caso de MM genitourinario¹⁹⁸.

La ruta PI3K-AKT-mTOR es una ruta muy frecuentemente alterada en gran proporción de los tumores malignos humanos. Esto unido a la relación existente entre su activación y la resistencia a ciertos tratamientos antineoplásicos⁶⁰ y la tendencia

comentada a la infraestimación de su afectación, sugiere que el papel en la patogénesis del MM podría ser mayor del supuesto hasta la fecha

6.3.3 OTROS GENES

El subtipo genético triple negativo, definido por la ausencia de mutaciones en los elementos críticos de la ruta MAPK, se caracteriza por un patrón diferencial de mutaciones: mientras que la frecuencia de mutaciones en TERT en los MC de subtipo BRAF, RAS o NF1 es superior al 90%, su frecuencia en el subtipo triple-negativo es del 6,7%, sugiriendo una vía alternativa de activación de TERT en estos tumores. Por el contrario, los tumores triple-negativos tienen una mayor frecuencia de amplificaciones en MDM2 y una menor incidencia de mutaciones en TP53⁶⁹.

Este subtipo presenta, asimismo, una mayor incidencia de genes de fusión: estas alteraciones previamente desconocidas, se han podido identificar mediante las tecnologías de secuenciación profunda y se conoce que pueden funcionar como mutaciones *driver*. Esto implica un impacto en la estratificación del riesgo ya que constituyen una posible diana terapéutica y una vía de resistencia a los inhibidores de MEK^{72,79}.

En nuestra serie identificamos otras mutaciones presentes de forma aislada en uno de los casos estudiados, y que afectaban a los genes CDKN2A, APC, ATM, MITF, FGFR1 y FGFR2. Con la excepción de FGFR1, todas ellas han sido notificadas previamente en estudios mediante NGS en MC y MM^{177-179,182}.

FGFR1 es un receptor de tirosina-quinasa capaz de activar tanto la ruta MAPK como PI3K-AKT-mTOR para generar una activación constitutiva de ERK. Las mutaciones en dicho gen se han demostrado como patogénicas en gran número de neoplasias malignas humanas, incluido el pulmón, próstata y mama¹⁹⁹ así como en el MC²⁰⁰ y en ciertos tipos de MM como el uveal²⁰¹. En el territorio nasosinusal, se han descrito mutaciones en dicho gen en la mayoría de los CNS^{202,203} pero, hasta la fecha, ningún estudio las había descrito en MMNS.

6.4 PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

En el tratamiento del MMNS, las limitaciones ya comentadas de los tratamientos locales (cirugía y RT) y la bioquimioterapia clásica, han enfocado la atención hacia las terapias dirigidas y la inmunoterapia, en la búsqueda de una terapia sistémica que pueda tener un impacto en el pronóstico de estos pacientes.

6.4.1 TERAPIAS DIRIGIDAS

Entre los inhibidores selectivos de la ruta MAPK, las moléculas de pequeño tamaño dirigidas contra BRAF mutado (vemurafenib, dabrafenib y encorafenib) han alcanzado respuestas muy significativas en el tratamiento de MC, en pacientes portadores de la mutación BRAF-V600, aumentando la SG en comparación con la QT^{25,190}, efectividad que se presupone superponible para el MM²⁰⁴.

Sin embargo, pese a ser la mutación más frecuentemente identificable y activable en los MC, la tasa de mutaciones en BRAF en nuestra serie fue del 0%, consistente con la literatura médica. Esto implica que, si bien los resultados del tratamiento con estas moléculas son prometedores, no es esperable que una alta proporción de pacientes con MMNS se puedan beneficiar de ellos. Asimismo, la alta incidencia de mutaciones en NF1 (33% en nuestra serie) en el MMNS se ha relacionado en estudios preclínicos con una mayor resistencia a los inhibidores de BRAF²⁵.

Progresando en la ruta metabólica (Figura 3), existen actualmente 3 inhibidores no competitivos con ATP de MEK aprobados por la FDA, dirigidos a MEK 1 (cobimetinib) y tanto a MEK 1 como a MEK 2 (trametinib y binimetinib) cuya eficacia no se vería necesariamente afectada por la existencia de mutaciones en NF1²⁰⁵.

Las combinaciones de inhibidores de BRAF y MEK en MC han demostrado beneficios clínicos superiores al compararlos con la monoterapia con inhibidores de BRAF, lo que los hace muy atractivos para el tratamiento del MM^{71,176}.

Los datos relativos a la eficacia de las terapias moleculares en los tumores con NF1 mutado están limitados al resultado de estudios preclínicos. Estos estudios, arrojan información que sostiene la actividad de inhibidores de MEK, de RAS y de la vía PI3K-AKT-mTOR⁶³.

- STAT3, un intermediario en la ruta metabólica PI3K-AKT-mTOR, es una diana potencial para el tratamiento de los tumores con NF1 mutado o deficiente. Su producto natural, cucurbitacin-1, (potente inhibidor de STAT3) ha demostrado inhibir el crecimiento de tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos tanto *in vitro* como *in vivo*.
- Los inhibidores de PAK1 (un efector de la ruta RAS) también han demostrado inhibir el crecimiento de los tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos con NF1 inactivo, así como los tumores malignos de mama con NF1 inactivo en estudios en ratones.
- Los inhibidores de MEK han demostrado efectividad en el tratamiento de líneas celulares con alteraciones en NF1, tanto de glioblastoma como de leucemia aguda mieloide y sarcomas de tejidos blandos. Esta deficiencia de NF1 se asocia con frecuencia a una resistencia adquirida a los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Sin embargo, administrados junto con inhibidores de MEK se ha apreciado una restauración de la sensibilidad.

Al considerar los inhibidores de la ruta PI3K-AKT-mTOR distinguimos entre los análogos de la rapamicina (sirolimus, temsirolimus, everolimus y deforolimus) que actúan aislando a mTOR e inhibiendo la señalización a partir de mTORC1 y los inhibidores de mTOR de nueva generación, que actúan anclándose al lugar de unión de ATP de mTOR inhibiendo la actividad catalítica de mTORC1 y mTORC2²⁰⁶.

Las evaluaciones preclínicas de estos inhibidores de nueva generación han demostrado resultados oncológicos superiores a los análogos de rapamicina en el tratamiento de los MM pero, si bien han tenido resultados prometedores en numerosos tumores, no han sido aprobados para el tratamiento del melanoma²⁰⁷.

Los inhibidores selectivos, tanto de la ruta MAPK como de PI3K-AKT-mTOR ven sus efectos limitados por los mecanismos de compensación y los bucles de feedback que operan entre dichas rutas y que subyacen a los mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida²⁰⁷. Esto determina que, en muchas ocasiones, la inhibición aislada de cualquiera de estas vías provoque la activación compensatoria de la otra, contrarrestando la supresión deseada del crecimiento, la proliferación y la supervivencia del tumor. En este sentido cabe destacar que, en 3 de nuestros 4 casos en los que se detectó una mutaciones en la ruta PI3K-AKT-mTOR, se identificó una comutación patogénica en un elemento crítico de la ruta MAPK, que no solo descarta el carácter mutuamente excluyente de estas mutaciones, sino que apoya que las terapias combinadas dirigidas a más de un *checkpoint* de las rutas de proliferación celular podrían ser superiores a la monoterapia.

Los inhibidores selectivos, tanto de la ruta MAPK como de PI3K-AKT-mTOR han demostrado, adicionalmente a su efecto antitumoral directo, aumentar la inmunogenicidad y por tanto facilitar la sensibilidad a la inmunoterapia.

Pese a que, en nuestra serie, no identificamos ningún paciente con mutaciones en KIT, existe un reducido número de inhibidores de KIT, con una eficacia variable en el tratamiento del MM y que consideramos que merecen una mención:

El nilotinib es un inhibidor de KIT de segunda generación, derivado de imatinib, con similar perfil pero mayor potencia²⁰⁸ que ha demostrado respuestas duraderas en MM previamente tratados y con resistencia adquirida²⁰⁹, con una tasa de respuesta global en torno al 20% y una LCR mayor del 50%^{210,211}.

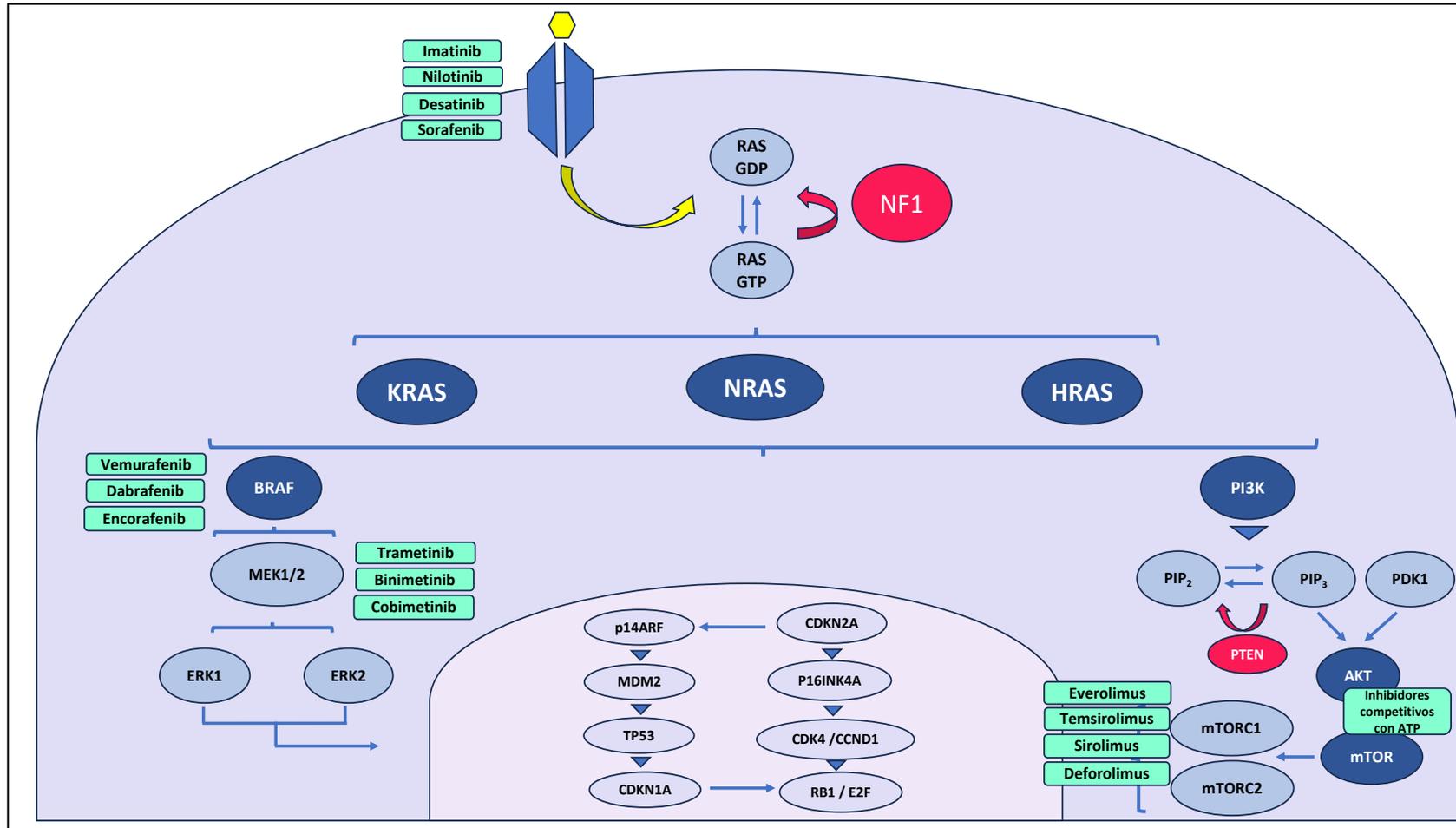
El desatinib es otro inhibidor de segunda generación que en estudios preclínicos ha demostrado una actividad superior. Sin embargo, esta superioridad no se ha confirmado en el ensayo fase 2 conducido por Nassar et al.²⁵. De forma puntual, Quintas-Cardama et al.²¹² publicaron un caso de un varón de 79 años con un MMAR metastásico tratado con sorafenib y temozolamida que presentó una respuesta completa durante 5 meses

La existencia de determinadas mutaciones en KIT, con mejor respuesta a la inhibición que otras, sugiere que únicamente ciertas variaciones en este gen son realmente oncogénicas y por tanto dianas terapéuticas^{25,208,210,213,214}. Desafortunadamente, la mayoría de pacientes que presenta una respuesta inicial a los inhibidores de KIT, lo hacen por breves periodos de tiempo, alcanzando la resistencia y finalmente la progresión²¹⁵.

Las principales terapias dirigidas hacia elementos de la ruta de las MAPK y PI3K-AKT-mTOR se resumen gráficamente en la Figura 13.

Figura 13

Punto de actuación de las diferentes terapias dirigidas aprobadas contra las mutaciones en la ruta de las MAPK y PI3K-AKT-mTOR.



Nota. Figura propia.

6.4.2 INMUNOTERAPIA

Pese a que en nuestra serie ningún paciente se benefició del tratamiento con inmunoterapia, consideramos que merece una mención. Esto viene motivado por la revisión de 1.910 MMCC realizada por Abiri et al.²⁴, en la que demostraron que la adición adyuvante de la inmunoterapia al tratamiento quirúrgico asociaba un incremento significativo de la SG, demostrándose estable en el subgrupo de MMNS independientemente de recibir o no RT.

Estos fármacos se conocen como inhibidores del punto de control inmunitario o inhibidores del *checkpoint*. Estos puntos de control o *checkpoints* son elementos del sistema inmune que buscan frenar la respuesta mediada por células T. Consecuentemente estos inhibidores, al bloquearlos, impiden que se envíe la señal inactivadora y permiten a las células T destruir las células tumorales. Dentro de este grupo de fármacos consideremos dos familias: los inhibidores dirigidos contra CTLA-4 y los inhibidores de PD-1 y PD-L1.

Ipilimumab es un anticuerpo humano tipo IgG dirigido a CTLA-4, un receptor inhibidor de los linfocitos T. Al bloquear este receptor, potencia la activación y proliferación de los linfocitos T y por tanto incrementa la inmunidad antitumoral. Este tratamiento ha demostrado un tasa de respuesta superior al 10% en el MM y una tasa de control objetivo de la enfermedad mayor al 30%²¹⁶, siendo la primera terapia que ha demostrado una ventaja en términos de supervivencia en los ensayos fase III^{217,218}. Dicha tasa de respuesta es la observada también en los primeros análisis retrospectivos en MMNS^{216,219}.

Los inhibidores de PD-1 constituyen otra modalidad de inmunoterapia aprobada como tratamiento adyuvante para el MC metastásico, pudiendo alcanzar supervivencias a los 5 años del 40-50%. Son fármacos, en general, bien tolerado y con una toxicidad manejable²²⁰ que han demostrado un beneficio significativo en supervivencia en melanomas operados estadio III^{112,221,222}, logrando rescatar al 30% de los pacientes que recaen con la cirugía y logrando una SLP del 30% en ensayos clínicos^{223,224}.

En los estudios que han analizado los resultados del tratamiento con inhibidores de PD1, dos ensayos randomizados fase 3^{225,226}, han demostrado la superioridad en el tratamiento del MC metastásico de nivolumab frente a ipilimumab en términos de SG, SLP, tasa de respuesta y tolerabilidad. Consecuentemente se ha postulado al nivolumab por delante del ipilimumab en el tratamiento, no solo del MC, sino también del MM.

La activación inmune del huésped desencadenada por los inhibidores del *checkpoint*, genera una gama única de efectos adversos conocidos como efectos adversos inmunomediados (EAI). La aparición e intensidad de estos EAI está en relación con el grado de activación inmune del huésped, que a su vez se ha relacionado con una respuesta antitumoral más potente^{227,228}.

Otsuka et al.¹⁴³ analizaron a 27 pacientes con MM tratados con nivolumab y observaron una incidencia de EAI cercana al 60%, la mayoría grado 1 o 2 (89%) siendo los más frecuentes los dermatológicos. Evidenciaron una tasa de respuesta objetiva 4 veces superior en los pacientes que presentaron algún EAI, con una tasa de control de la enfermedad superior al 80% (frente a cifras inferiores al 20% en los que no los manifestaron). Dichos hallazgos se tradujeron en una SG y SLP significativamente superior en el grupo que padeció algún EAI.

Consecuencia de su alta tasa de respuesta, la duración de la misma, la mejora en la SG y la baja incidencia de efectos adversos, autores como Ascierto et al.¹⁵ sugieren el uso de inhibidores de PD-1 como primera línea de inmunoterapia.

Los inhibidores de PDL1 (atezolizumab, avelumab y durvalumab) han sido aprobados recientemente como otra forma de inmunoterapia para el cáncer por la FDA, pero aún están en fase de estudio y evaluación en MM²⁵.

En el estudio realizado por Amit et al.⁸² en 2018 comparando el tratamiento de MM metastásico con inhibidores de CTLA-4 y PD-1 apreciaron una respuesta global cercana al 40% en los pacientes tratados con combinación de estos inhibidores (ipilimumab y nivolumab), próxima al 25% en los tratados con nivolumab y menor del

10% en aquellos tratados con ipilimumab en monoterapia. Este interés en la combinación de ambos inhibidores del *checkpoint* ya había sido sugerido por D'Angelo et al.²²⁹ aunque demostró menor respuesta en el MM que en el MC.

Mignard et al.²³⁰ compararon la respuesta al tratamiento con inmunoterapia frente a bioquimioterapia en el MM y observaron una SG estadísticamente superior en aquellos tratados con inmunoterapia, y dentro de esta, a los tratados con inhibidores de PD-1 frente a los inhibidores de CTLA-4. Esta apreciación fue comprobada para el MMNS por Ganti et al.¹¹⁵ que en 2020 tras analizar los datos procedentes de la *National Cancer Data Base* comprobaron que, el haber recibido inmunoterapia, actuaba como factor predictor de mejor supervivencia en los pacientes con metástasis a distancia.

Estos hallazgos sugieren que, a los pacientes con MM, se les debe ofrecer la inmunoterapia como estándar de tratamiento. En el MMCC, actualmente, las guías británicas³⁰ recomiendan que, en la enfermedad avanzada o metastásica, los inhibidores del *checkpoint* (combinación de anti CTLA-4 con anti PD-1 o bien monoterapia anti PD-1 si el paciente no tolera la combinación) pueden ser ofertados. Asimismo, cuando el tumor presente la mutación correspondiente, las terapias dirigidas contra BRAF o KIT puede ser consideradas, tanto en primera línea como ante el fracaso del tratamiento.

6.5 LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Este estudio adolece de las limitaciones propias de la mayoría de los estudios centrados en los MMNS (y, en general, de aquellos centrados en patologías infrecuentes y de mal pronóstico): se trata de un estudio retrospectivo, realizado sobre un número limitado de pacientes, tratados con regímenes terapéuticos inconstantes basados en la experiencia de profesionales expertos.

Los estudios retrospectivos constituyen una herramienta importante para el estudio de enfermedades infrecuentes, y sus hallazgos pueden establecer la base sobre la cual se planifiquen y desarrollen los estudios prospectivos subsiguientes. Se trata, sin

embargo, de estudios con un peso estadístico relativo, que no permiten hacer afirmaciones causales, únicamente correlaciones.

Fruto de su naturaleza retrospectiva nos encontramos ante una limitación en cuanto a la información obtenida. Esto se manifestó, por ejemplo, en el tratamiento de los antecedentes de exposición y consumo tóxicos de nuestros pacientes, dado que la información se obtuvo de historias clínicas no diseñadas para recoger los datos que pretendimos valorar. No obstante, la no realización de entrevistas clínicas con los pacientes sujetos a estudio eliminó el posible sesgo de memoria asociado a este tipo de estudios.

El limitado tamaño muestral del que partíamos inicialmente se vio reducido prácticamente a la mitad para el análisis genético y molecular. Incluso dentro de dicho análisis se perdieron casos por consumo de la muestra durante el mismo. Esto limitó la posibilidad de hacer un análisis de supervivencia en base a los resultados genéticos que pudiese arrojar conclusiones más sólidas.

Se identificaron ciertas características, que limitaron la viabilidad de las muestras sometidas al análisis genético y molecular: la tinción melánica intensa, si bien favorece el diagnóstico clínico e IHQ, demostró artefactar en gran medida los estudios moleculares; las muestras incluidas en parafina demostraron ser de menor calidad al encontrarse muy fragmentadas; por último el no tener en cuenta los análisis que se iban a realizar *a priori* limitó la recolección de muestras de sangre periférica pareada con el tumor en ciertos casos, una circunstancia potencialmente evitable.

Es por ello por lo que merece una mención especial el destacar que, en todo momento, durante el estudio y tratamiento de este tipo de tumores tan infrecuentes, debemos tener presente la necesidad de obtener una muestra histológica de calidad y del mayor tamaño posible, sin perjuicio del manejo clínico del paciente.

Si bien la exigencia de los criterios de inclusión y exclusión aplicados implicó una reducción considerable de nuestro tamaño muestral, no podemos dejar de valorarlo

como una fortaleza de nuestro estudio, que lo destaca frente a otras series con mayor número de casos. Consideramos que nuestra serie está compuesta por muestras de gran calidad, en las que se hicieron múltiples análisis, algunos de ellos redundantes, con el fin de aportar consistencia y seguridad a los resultados obtenidos. En ellas, asimismo, se llevó a cabo un análisis pareado de ADN tumoral y germinal que permitió discernir de forma inequívoca el carácter somático o germinal de las mutaciones.

Todos los pacientes de nuestra muestra, a quienes se les planteó un tratamiento con intención curativa, fueron tratados quirúrgicamente como primera modalidad terapéutica. Sin embargo, la tasa de uso de la RT adyuvante fue marginal y la de las terapias sistémicas fue anecdótica. Si bien, el impacto real de utilizar estas terapias está en tela de juicio, el no utilizarlas implicó necesariamente que no pudiéramos obtener conclusiones a este respecto.

6.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Las particularidades inmunes locales asociadas a los procesos oncológicos, han suscitado un gran interés en el estudio de la patología oncológica desde el mismo momento en el que se identificó la habilidad para evadir la respuesta inmune como una señal de identidad del cáncer²³¹. Esta habilidad se basa en la capacidad de las células tumorales para modificar el microambiente circundante y las señales del sistema inmune y de esa forma evitar la actividad inmunitaria.

El progreso en los estudios de inmunoterapia, ha conducido al reconocimiento del valor pronóstico de esta capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune⁷, habiéndose demostrado tanto en tumores de cabeza y cuello^{232,233} como en otros CNS por nuestro grupo en trabajos previos^{234,235}.

Esto ha suscitado un gran interés en analizar el posible impacto pronóstico de diferentes factores inmunes en el MMNS. Consecuentemente diferentes estudios han iniciado la caracterización del valor pronóstico de diferentes marcadores inmunitarios en el melanoma:

- Los linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) son un reflejo de la respuesta inmune antitumoral y, dada su habilidad para el reconocimiento y destrucción de las células tumorales, una alta infiltración del TIL se asocia con un mejor pronóstico. Esta determinación ha sido demostrada por dos metaanálisis recientes en MC^{236,237} y ha sido corroborado para los MM²³⁸.
- El antígeno específico de tumor Nueva York de carcinoma escamoso de esófago 1 (NY-ESO-1) es un antígeno con múltiples epítomos, lo que lo convierte en uno de los antígenos más inmunógenos capaces de activar la respuesta inmune celular y humoral. Es expresado por una amplia variedad de tumores malignos y a diferentes niveles, identificándose en el suero del 50% de los pacientes con MC, confiriéndoles un mejor pronóstico²³⁸.
- El papel de los macrófagos asociados al tumor ha sido estudiado particularmente en el MMNS por Shi et al.²³⁹ demostrando que su activación y reclutamiento desempeña un rol en la progresión tumoral y neoangiogénesis, y que su recuento se asocia con la progresión tumoral y el pronóstico.

Sin embargo, no existen hasta la fecha estudios centrados en estas particularidades en los MMCC ni en el MMNS. Dado el mal pronóstico inherente a esta patología, consideramos que resultaría de gran interés profundizar en su caracterización inmune.

Si bien consideramos que el método de análisis molecular empleado en nuestro estudio puede emplearse para ayudar a definir estrategias de tratamiento dirigido, la gran heterogeneidad molecular dificulta la identificación de patrones comunes y, en fin último, la alteración genética primigenia. Con este objetivo final en mente, se postulan otros abordajes de diagnóstico molecular, como los estudios *single cell* o los estudios en células madre, que aún se encuentran en fase de desarrollo y lejos de la aplicabilidad clínica.

7. CONCLUSIONES

- 1) La serie estudiada refleja adecuadamente los principales aspectos clínicos descritos y analizados en las diferentes series publicadas, pudiendo considerarla como representativa de esta patología.
- 2) El abordaje endoscópico ha demostrado ser una modalidad terapéutica aceptable, que aporta a su incuestionable beneficio cosmético y en términos de calidad de vida, la no inferioridad (e incluso superioridad) en términos de supervivencia, habiéndose eliminado el sesgo de selección.
- 3) La ruta de las MAPK se encontró mutada, en uno o más de sus elementos críticos, en una alta proporción de melanomas nasosinuales analizados (47%). Si bien es cierto que la frecuencia de dichas mutaciones, así como los elementos afectados, difieren con respecto al melanoma cutáneo, su presencia los hace potenciales candidatos a terapias sistémicas dirigidas.
- 4) Identificamos, de forma diferencial con el resto de series, una incidencia de mutaciones inactivadoras en NF1 del 33%. Identificamos 2 tumores que albergaban deleciones intragénicas inactivadoras, previamente no descritas en la literatura y no identificables mediante las técnicas de NGS empleadas habitualmente.
- 5) No se pudo establecer una relación estadísticamente significativa entre el estatus mutacional de la ruta MAPK y la supervivencia en ninguna de sus formas, tanto al estudiar cada mutación por separado como al analizar el sumatorio de mutaciones en cada caso.
- 6) No existen, hasta la fecha, marcadores inmunohistoquímicos que permitan predecir el estatus mutacional de la ruta de las MAPK, por lo que el estudio genético de estos tumores sigue siendo necesario para identificar potenciales dianas terapéuticas. Pese a que no existen marcadores inmunohistoquímicos con valor pronóstico probado, tanto pERK como Ki67 han demostrado resultados favorables que deberán ser confirmados en estudios ulteriores.

- 7) El 27% de la muestra analizada, presentó mutaciones potencialmente patogénicas en elementos críticos de la ruta PI3K-AKT-mTOR, lo que los convertiría en potenciales candidatos para terapias dirigidas a esta ruta metabólica. El 75% de dichas mutaciones se presentó en comutación con NRAS.

- 8) Considerando en conjunto las mutaciones identificadas en la ruta MAPK y la ruta PI3K, el 53% de los casos analizados en nuestra serie presentaron, al menos, una mutación que los posicionaba como potenciales candidatos al tratamiento con terapias sistémicas dirigidas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Levine H. and Clemente M. Sinus surgery endoscopic and microscopic approaches. 1st ed. New York: Thieme Medical Publishers; 2005.
2. Al-Qahtani A., Haidar H. and Larem A. Textbook of clinical otolaryngology. 1st ed. Switzerland: Springer; 2021.
3. Lund V., Howard D. and Wei W. Tumors of the nose, sinuses and nasopharynx. 1st ed. New York: Thieme Medical Publishers; 2014.
4. Franchi A. Pathology of sinonasal tumors and tumor-like lesions. 1st ed. Switzerland: Springer; 2020.
5. Llorente JL., López F., Suárez C. and Hermsen M. Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2014; 11: 460-472.
6. Lian B., Cui CL., Zhou L., Song X., Wu D., Si L., et al. The natural history and patterns of metastases from mucosal melanoma: an analysis of 706 prospectively-followed patients. *Ann Oncol.* 2017; 28: 868-873.
7. Al-Haseni A., Vrable A., Qureshi M., Mathews S., Pollock S., Truong., et al. Survival outcomes of mucosal melanoma in the USA. *Futur. Oncol.* 2019; 15: 3977-3986.
8. Salari B., Foreman R., Emerick K., Lawrence D. and Duncan L. Sinonasal mucosal melanoma: an update and review of the literature. *Am J Dermatopathol.* 2022; 44: 424-432.
9. Çomoglu S., Polat B., Çelik M., Sahin B., Enver N., Kele M., et al. Prognostic factors in head and neck mucosal malignant melanoma. *Auris Nasus Larynx.* 2018; 45:135-142.
10. Oldenburg M. and Price D. The utility of sentinel node biopsy for sinonasal melanoma. *J Neurol Surg B.* 2017; 78: 425-429.
11. Konuthula N., Khan M., Parasher A., Del Signore A., Genden E., Govindaraj S., et al. The presentation and outcomes of mucosal melanoma in 695 patients. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2017; 7: 99-105.
12. Meerwein C., Hülner M., Braun R., Soyka M., Morand G. and Holzmann D. Current concepts in advanced sinonasal mucosal melanoma: a single institution experience. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn.* 2019; 276: 2259-2265.

13. Dauer E., Lewis J., Rohlinger A., Weaver A., Olsen K. Sinonasal melanoma: a clinicopathologic review of 61 cases. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2008; 138: 347-352.
14. Spencer K. and Mehnert J. Mucosal melanoma: epidemiology, biology and treatment. *Cancer Treat Res.* 2016; 167: 295-320.
15. Ascierto P., Accorona R., Botti G., Farina D., Fossati P., Gatta G., et al. Mucosal melanoma of the head and neck. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 2017; 112:136-152.
16. Van Dijk M., Sprenger S., Rombout P., Marres H., Kaanders J., Jeuken J., et al. Distinct chromosomal aberrations in sinonasal mucosal melanoma as detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom. Cancer.* 2003; 36: 151-158.
17. Patel S., Prasad M., Escrig M., Singh B., Shaha A., Kraus D., et al. Primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Head Neck.* 2002; 24: 247-257.
18. Amit M., Tam S., Abdelmeguid A., Roberts D., Takahashi Y., Raza S., et al. Mutation status among patients with sinonasal mucosal melanoma and its impact on survival. *Br. J. Cancer.* 2017; 116: 1564-1571.
19. Dréno M., Georges M., Espitalier F., Ferron C., Charnole A., Dréno B., et al. Sinonasal mucosal melanoma: a 44-case study and literature analysis. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* 2017; 134: 237-242.
20. Elsamna S., Ahsanuddin S., Ghayoor M., Sukyte-Raube D., Fang C., Baredes S., et al. Surgical margin status and survival following resection of sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope.* 2021; 131: 2429-2435.
21. Liétin B., Montalban A., Louvrier C., Kemeny J., Mom T. and Gilain L. Sinonasal mucosal melanomas. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* 2010; 127: 70-76.
22. Turner J. and Reh D. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck.* 2012; 34: 877-885.
23. Jangard M., Hansson J. and Ragnarsson-Olding B. Primary sinonasal malignant melanoma: a nationwide study of the swedish population, 1960-2000. *Rhinol. J.* 2013; 51: 22-30.

24. Abiri A., Yasaka T., Lehrich B., Goshtasbi K., Papagiannopoulos P., Tajudeen B., et al. Adjuvant therapy and prognosticators of survival in head and neck mucosal melanoma. *Laryngoscope*. 2022; 132: 584-592.
25. Nassar K. and Tan A. The mutational landscape of mucosal melanoma. *Semin. Cancer Biol.* 2020; 61: 139-148.
26. Xu Q., Li Q., Huang C., Cai M., Zhang M., Yin S., et al. Prognostic value of an immunohistochemical signature in patients with head and neck mucosal melanoma. *Front. Immunol.* 2021; 12: 1-9.
27. Calderón-Garcidueñas L., Delgado R., Calderón-Garcidueñas A., Meneses A., Ruiz L., De La Garza J., et al. Malignant neoplasms of the nasal cavity and paranasal sinuses: a series of 256 patients in Mexico City and Monterrey. Is air pollution the missing link?. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2000; 122: 499-508.
28. Roberto A., Larsson B. and Tjälve H. Uptake of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene in melanin-containing tissues. *Pharmacol. Toxicol.* 1996; 79: 92-99.
29. Wróblewska J., Dias-Santagata D., Ustaszewski A., Cheng-Lin W., Fujimoto M., Selim M., et al. Prognostic Roles of BRAF, KIT, NRAS, IGF2R and SF3B1 mutations in mucosal melanomas. *Cells.* 2021; 10.
30. Edmond M., Nenclares P., Harrington K., Dafydd D., Bagwan I., Begg D., et al. What is the role of the surgeon in the management of head and neck mucosal melanoma in the immunotherapy era? *Head Neck.* 2021; 43: 3498-3503.
31. Zhu W., Li S., Zou B., Liu H., Wang S. Expressions and clinical significance of HER4 and CD44 in sinonasal mucosal malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2018; 28: 105-110.
32. Hintzsche J., Gorden N., Amato C., Kim J., Wuensch K., Robinson S. Whole-exome sequencing identifies recurrent SF3B1 R625 mutation and comutation of NF1 and KIT in mucosal melanoma. *Melanoma Res.* 2017; 27: 189-199.
33. McLean N., Tighiouart M. and Muller S. Primary mucosal melanoma of the head and neck. Comparison of clinical presentation and histopathologic features of oral and sinonasal melanoma. *Oral Oncol.* 2008; 44: 1039-1046.

34. Moreno M. and Hanna E. Management of mucosal melanomas of the head and neck: did we make any progress? *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2010; 18: 101-106.
35. Moya-Plana A., Mangin D., Dercle L., Taouachi R., Casiraghi O., Ammari S., et al. Risk-based stratification in head and neck mucosal melanoma. *Oral Oncol.* 2019; 97: 44-49.
36. Sekine T., Barbosa F., Kuhn F., Burger I., Stolzmann P., Huber G., et al. PET+MR versus PET/CT in the initial staging of head and neck cancer, using a trimodality PET/CT+MR system. *Clin. Imaging.* 2017; 42: 232-239.
37. Jingu K., Kishimoto R., Mizoe J., Hasegawa A., Bessho H., Tsuji H., et al. Malignant mucosal melanoma treated with carbon ion radiotherapy with concurrent chemotherapy: prognostic value of pretreatment apparent diffusion coefficient (ADC). *Radiother. Oncol.* 2011; 98: 68-73.
38. Goerres G., Stoeckli S., Von Schulthess G., Steinert H. FDG PET for mucosal malignant melanoma of the head and neck. 2002; 112: 381-385.
39. Mikkelsen L., Larsen AC., Von Buchwald C., Drzewiecki K., Prause J. and Heegaard S. Mucosal malignant melanoma – a clinical, oncological, pathological and genetic survey. *Apmis.* 2016; 124: 475-486.
40. Thompson L., Wieneke J. and Miettinen M. Sinonasal tract and nasopharyngeal melanomas: a clinicopathologic study of 115 cases with a proposed staging system. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003; 27: 594-611.
41. Göde S., Turhal G., Tarhan C., Yaman B., Kandiloglu G., Öztürk K. Primary sinonasal malignant melanoma: effect of clinical and histopathologic prognostic factors on survival. *Balkan Med. J.* 2017; 34: 255-262.
42. Chraybi M., Alsamad I., Copie-Bergman C., Baia M., Andre J., Dumaz N., et al. Oncogene abnormalities in a series of primary melanomas of the sinonasal tract: NRAS mutations and cyclin D1 amplification are more frequent than KIT or BRAF mutations. *Human Pathology.* 2013; 44: 1902-1911.
43. Kim D., Kim D., Kim S., Kim D., Lee C., Rhee C. Ki67 antigen as a predictive factor for prognosis of sinonasal mucosal melanoma. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2008; 1: 206-210.

44. Guo R., Jenkins B., Johnson B., Reed K., Kroneman T., and Choby G. Sinonasal mucosal melanoma: role of tumor proliferative indices and pathological factors in survival. *Laryngoscope*. 2022; 132: 2350-2358.
45. Turri-Zanoni M., Medicina D., Lombardi D., Ungari M., Balzarini P., Rossini C., et al. Sinonasal mucosal melanoma: molecular profile and therapeutic implications from a series of 32 cases. *Head Neck*. 2013; 35: 1066-1077.
46. Regauer S., Ott A., Berghold A. and Beham A. CD44 expression in sinonasal melanomas: Is loss of isoform expression associated with advanced tumour stage? *J. Pathol*. 1999; 187: 184-190.
47. Grünmüller L., Thierauf J., Weissinger S., Bergmann C., Bankfalvi A., Veit J., et al. Biopanel identifies expression status of targetable proteins in sinonasal melanoma. *Per. Med*. 2016; 13: 291-301.
48. Bartell H., Bedikian A., Papadopoulos N., Dett T., Ballo M., Myers J., et al. Biochemotherapy in patients with advanced head and neck mucosal melanoma. *Head Neck*. 2008; 30: 1592-1598.
49. Ballantyne A. Malignant melanoma of the skin of the head and neck. An analysis of 405 cases. *Am. J. Surg*. 1970; 120: 425-431.
50. Prasad M., Patel S., Huvos A., Shah J. and Busam K. Primary mucosal melanoma of the head and neck: a proposal for microstaging localized, stage I (lymph node-negative) tumors. *Cancer*. 2004; 100: 1657-1664.
51. Koivunen P., Bäck L., Pukkila M., Laranne J., Kinnunen I., Grénman R., et al. Accuracy of the current TNM classification in predicting survival in patients with sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope*. 2012; 122: 1734-1738.
52. Shuman A., Light E., Olsen S., Pynnonen M., Taylor J., Johnson T., et al. Mucosal melanoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2011; 137: 331-337.
53. Houette A., Gilain L., Mulliez A., Mom T. and Saroul N. Prognostic value of two tumour staging classifications in patients with sinonasal mucosal melanoma. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis*. 2016; 133: 313-317.
54. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. 2018.
55. Morrison D. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2012; 4.

56. Lourenço S., Fernandez J., Hsieh R., Coutinho-Camillo C., Bologna S., Sanguenza M., et al. Head and neck mucosal melanoma: a review. *Am. J. Dermatopathol.* 2014; 36: 578-587.
57. Philpott C., Tovell H., Frayling I., Cooper D. and Upadhyaya M. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Human Genomics.* 2017; 11.
58. Kiuru M. and Busam K. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Lab. Invest.* 2017; 97: 146-157.
59. Courtney K., Corcoran R and Engelman J. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 1075-1083.
60. Hartmann W., Kuchler J., Koch A., Friedrichs N., Waha A., Endl E., et al. Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 4538-4545.
61. Poetsch M., Lorenz G. and Kleist B. Detection of new PTEN/MMAC1 mutations in head and neck squamous cell carcinomas with loss of chromosome 10. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2002; 132: 20-24.
62. Imbard A., Pasmant E., Sabbagh A., Luscan A., Soares M., Goussard P., et al. NF1 single and multi-exons copy number variations in neurofibromatosis type 1. *J. Hum. Genet.* 2015; 60: 221-224.
63. Yap Y., McPherson J., Ong C., Rozen S., Teh B., Lee A., et al. The NF1 gene revisited -from bench to bedside. *Oncotarget.* 2014; 5: 5873-5892.
64. Wan P., Garnett M., Roe S., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V., et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004; 116: 855-867.
65. Messiaen L., Callens T., Mortier G., Beysen D., Vendenbroucke I., Van Roy N., et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum. Mutat.* 2000; 15: 541-555.
66. Valero M., Martin Y., Hernández-Imaz E., Meleán G., Valero A., Rodríguez-Álvarez J., et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J. Mol. Diagnostics.* 2011; 13: 113-122.

67. Sabbagh A., Pasmant E., Imbard A., Luscan A., Soares M., Blanché H., et al. NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the french experience. *Hum. Mutat.* 2013; 34: 1510-1518.
68. Hsiao M., Piotrowski A., Callens T., Fu C., Wimmer K., Claes K., et al. Decoding NF1 intragenic copy-number variations. *Am. J. Hum. Genet.* 2015; 97: 238-249.
69. Akbani R., Akdemir K., Aksoy A., Albert M. Ally A., Amin S., et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015; 161: 1681-1696.
70. Dahl C. and Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *Apmis.* 2007; 115: 1161-1176.
71. Tsushima N., Kano S., Hatanaka K., Suzuki T., Hamada S., Idogawa H., et al. Targeted next-generation sequencing of Japanese patients with sinonasal mucosal melanomas identifies frequent NRAS and CTNNB1 mutations. *Auris Nasus Larynx.* 2024; 51: 313-319.
72. Kim H., Jung M., Kang H., Kim H., Park C., Kim S., et al. oncogenic BRAF fusions in mucosal melanomas activate the MAPK pathway and are sensitive to MEK/PI3K inhibition or MEK/CDK4/6 inhibition. *Oncogene.* 2017; 36: 3334-3345.
73. Omholt K., Grafström E., Kanater-Lewensohm L., Hansson J. and Ragnarsson-Olding B. KIT pathway alterations in mucosal melanomas of the vulva and other sites. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 3933-3942.
74. Dumaz N., Jouenne F., Delyon J., Mouah S., Bensussan A., Lebbé C. Atypical BRAF and NRAS mutations in mucosal melanoma. *Cancers.* 2019; 11: 1133-1146.
75. Zebary A., Jangard M., Omholt K., Ragnarsson-Olding B. and Hansson J. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: A study of 56 cases. *Br. J. Cancer.* 2013; 109: 559-564.
76. Wroblewska J., Mull J., Wu C., Fujimoto M., Ogawa T., Marszalek A., et al. SF3B1, NRAS, KIT, and BRAF mutation; CD117 and cMYC expression; and tumoral pigmentation in sinonasal melanomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2019; 43: 168-177.
77. Samstein R., Carvajal R., Postow M., Callahan M., Shoushtari A., Patel S., et al. Localized sinonasal mucosal melanoma: outcomes and associations with stage, radiotherapy and PET response. *Head Neck.* 2016; 38: 1310-1317.

78. Cosgarea I., Ugurel S., Sucker A., Livingstone E., Zimmer L., Ziemer M., et al. Targeted next generation sequencing of mucosal melanomas identifies frequent NF1 and RAS mutations. *Oncotarget*. 2017; 25: 40683-40692.
79. Moran J., Le L., Nardi V., Golas J., Farahani A., Signorelli S. Identification of fusions with potential clinical significance in melanoma. *Mod. Pathol.* 2022; 35: 1837-1847.
80. Richa T., Lee A., and Cohen M. Evolution in sinonasal mucosal melanoma management. *J. Neurol. Surg. Rep.* 2022; 83: 1-2.
81. Howard D., Lund V. and Wei W. Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses: a 25-year experience. *Head Neck*. 2006; 28: 867-873.
82. Amit M., Na'ara S. and Hanna E. Contemporary treatment approaches to sinonasal mucosal melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* 2018; 20: 10-20.
83. Crippen M., Kiliç S. and Eloy J. Updates in the management of sinonasal mucosal melanoma. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2017; 26: 52-57.
84. Cao W., Guan B., Yu A., Xu L., Wang Y., Kafle S., et al. Treatment and outcomes of endoscopic surgery and traditional open resection in sinonasal mucosal melanoma. *Acta Otolaryngol.* 2017; 137: 862-867.
85. Nicolai P., Battaglia P., Bignami M., Bolzoni A., Delu G., Khrais T., et al. Endoscopic surgery for malignant tumors of the sinonasal tract and adjacent skull base: A 10-year experience. *Am. J. Rhinol.* 2008; 22: 308-316.
86. Arnold A., Ziglinas P., Ochs K., Alter N., Geretschläger A., Lädach K., et al. Therapy options and long-term results of sinonasal malignancies. *Oral Oncol.* 2012; 48: 1031-1037.
87. Chen M. Minimally invasive endoscopic resection of sinonasal malignancies and skull base surgery. *Acta Otolaryngol.* 2006; 126: 981-986.
88. Kim B., Kim D., Kim S., Han D., Kim D., Rhee C., et al. Endoscopic versus traditional craniofacial resection for patients with sinonasal tumors involving the anterior skull base. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2008; 1: 148-153.

89. Swegal W., Koyfman S., Scharpf J., Sindwani R., Greskovich J., Borden E., et al. Endoscopic and open surgical approaches to locally advanced sinonasal melanoma comparing the therapeutic benefits. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014; 140: 840-845.
90. Hur K., Zhang P., Yu A., Kim-Orden N., Kysh L., Wrobel B. Open versus endoscopic approach for sinonasal melanoma: a systematic review and meta-analysis. 2019; 0: 1-8.
91. Lund V. and Wei W. Endoscopic surgery for malignant sinonasal tumours: An eighteen year experience. *Rhinology.* 2015; 53: 204-211.
92. Miglani A., Patel S., Kosiorek H., Hinni M., Hayden R. and Lal D. Endoscopic resection of sinonasal mucosal melanoma has comparable outcomes to open approaches. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2017; 31: 200-204.
93. Li W., Yu Y., Wang H., Yan A. and Jiang X. Evaluation of the prognostic impact of postoperative adjuvant radiotherapy on head and neck mucosal melanoma: A meta-analysis. *BMC Cancer.* 2015; 21.
94. Leong S., Accortt N., Essner R., Ross M., Gershenwald J., Pockaj B. Impact of sentinel node status and other risk factors on the clinical outcome of head and neck melanoma patients. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2006; 132: 370-373.
95. Penel N., Mallet Y., Mirabel X., Ton Van J. and Lefebvre JL. Primary mucosal melanoma of head and neck: Prognostic value of clear margins. *Laryngoscope.* 2006; 116: 993-995.
96. Krengli M., Jereczek-Fossa B., Kaanders J., Masini L., Beldi D. and Orecchia R. What is the role of radiotherapy in the treatment of mucosal melanoma of the head and neck? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008; 65: 121-128.
97. Mendenhall W., Amdur R., Hinerman R., Werning J., Villaret D and Mendenhall N. Head and neck mucosal melanoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 2005; 28: 626-630.
98. Temam S., Mamelle G., Marandas P., Wibault P., Avril M., Janot F. et al. Postoperative radiotherapy for primary mucosal melanoma of the head and neck. *Cancer.* 2005; 103: 313-319.

99. Moreno M., Robets D., Kupferman M., DeMonte F., El-Naggar A., Williams M. et al. Mucosal melanoma of the nose and paranasal sinuses, a contemporary experience from the M. D. Anderson cancer center. *Cancer*. 2010; 116: 2215-2223.
100. Benlyazid A., Thariat J., Temam S., Malard O., Florescu C., Choussy O. et al. Postoperative radiotherapy in head and neck mucosal melanoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2010; 136: 1219-1225.
101. Krengli M., Masini L., Kaanders J., Maingon P., Bing S., Zouhair A. et al. Radiotherapy in the treatment of mucosal melanoma of the upper aerodigestive tract: Analysis of 74 cases. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2006; 65: 751-759.
102. Owens J., Roberts D. and Myers J. The role of postoperative adjuvant radiation therapy in the treatment of mucosal melanomas of the head and neck region. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2003; 129: 864-868.
103. Wushou A., Hou J., Zhao Y. and Miao X. Postoperative adjuvant radiotherapy improves loco-regional recurrence of head and neck mucosal melanoma. *J. Cranio-Maxillofacial Surg*. 2015; 43: 553-558.
104. Wushou A. and Zhao Y. The management and site-specific prognostic factors of primary oral mucosal malignant melanoma. *J. Craniofac. Surg*. 2015; 26: 430-434.
105. Yanagi T., Mizoe J., Hasegawa A., Takagi R., Bessho H., Onda T., et al. Mucosal malignant melanoma of the head and neck treated by carbon ion radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 2009; 74: 15-20.
106. Shibuya H., Takeda M., Matsumoto S., Hoshina M., Suzuki S. and Takagi M. The efficacy of radiation therapy for a malignant melanoma in the mucosa of the upper jaw: an analytic study. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 1992; 25: 35-39.
107. Harwood A. and Cummings B. Radiotherapy for mucosal melanomas. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 1982; 8: 1121-1126.
108. Madani I., Bonte K., Vakaet L., Boterberg T. and De Neve W. Intensity-modulated radiotherapy for sinonasal tumors: Ghent University Hospital update. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 2009; 73: 424-432.

109. Yao J., Zhang F., Zhang G., Deng X., Zhang W., Lawrence W., et al. Efficacy and safety of primary surgery with postoperative radiotherapy in head and neck mucosal melanoma: A single-arm phase II study. *Cancer Manag. Res.* 2018; 10: 6985-6996.
110. Hafström A., Brun E., Persson S., Sjövall J., Wahlberg P, and Greiff L. Survival benefits from concomitant chemoradiotherapy before radical surgery in stage IVA sinonasal mucosal melanoma? *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* 2019;4: 624-631.
111. Harting M. and Kim K. Biochemotherapy in patients with advanced vulvovaginal mucosal melanoma. *Melanoma Res.* 2004; 14: 517-520.
112. Long G., Hauschild A., Santinami M., Atkinson V., Mandala M., Chiarion-Sileni V., et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in stage III BRAF -mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2017; 337: 1813-1823.
113. Dummer R., Ascierto P., Gogas H., Arance A., Mandala M., Liskay 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: 603-615.
114. Larkin J., Ascierto P., Dréno B., Atkinson V., Liskay G., Maio M., et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -mutated melanoma. *N. Eng. J. Med.* 2014; 371: 1867-1876.
115. Ganti A., Raman A., Shay A., Kuhar H., Auger S., Patel T., et al. Treatment modalities in sinonasal mucosal melanoma: A national cancer database analysis. *Laryngoscope.* 2019; 130: 275-282.
116. Chapman P., Einhorn L., Meyers M., Saxman S., Destro A., Panageas K., et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus Dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 2745-2751.
117. Eton O., Legha S., Bedikian A., Lee J., Buzaid A., Hodges C., et al. Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: Results from a phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2045-2052.

118. Kato J., Tsutsumida A., Namikawa K., Tanaka R. et al Yamazaki N. Case of advanced melanoma who died from meningitis carcinomatosa after carboplatin and paclitaxel with good response. *J. Dermatol.* 2014; 41: 654-655.
119. De Mendonça U., Cernea C., Matos L. and Monteiro R. Analysis of KIT gene mutations in patients with melanoma of the head and neck mucosa: a retrospective clinical report. *Oncotarget.* 2018; 9: 22886-22894.
120. Lund V., Chisholm E., Howard D. and Wei W. Sinonasal malignant melanoma: An analysis of 115 cases assessing outcomes of surgery, postoperative radiotherapy and endoscopic resection. *Rhinology.* 2012; 50: 203-210.
121. De Virgilio A., Costantino A., Canzano F., Accorona R., Mercante G., Ferreli F., et al. Regional disease control in sinonasal mucosal melanoma: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2021; 43: 705-715.
122. Cheng Y., Lai C., Ho C., Shu C. and Lin C. Toward a better understanding of sinonasal mucosal melanoma: clinical review of 23 cases. *J. Chin. Med. Assoc.* 2007;M 70: 24-29.
123. Bridger A., Smee D., Baldwin M., Kwok B. and Bridger P. Experience with mucosal melanoma of the nose and paranasal sinuses. *ANZ J. Surg.* 2005; 75: 192-197.
124. Jethanamest D., Vila P., Sikora A. and Morris L. Predictors of survival in mucosal melanoma of the head and neck. *Ann. Surg. Oncol.* 2001; 18: 2748-2756.
125. Sun C., Chen Y., Jiang Y., Hu Z., Yang A. and Song M. Treatment and prognosis of oral mucosal melanoma. *Oral Oncol.* 2012; 48: 647-652.
126. Suzuki H., Takano G., Hanai N., Nishikawa D., Koide Y., Beppu S., et al. Primary tumor size predicts distant metastasis of mucosal malignant melanoma in head and neck. *Anticancer Res.* 2018; 38: 6459-6490.
127. Heppt M., Roesch A., Weide B., Gutzmer R., Meier F., Loquai C., et al. Prognostic factors and treatment outcomes in 444 patients with mucosal melanoma. *Eur. J. Cancer.* 2017; 81: 36-44.

128. Thariat J., Poissonnet G., Marcy P., Lattes I., Butori C., Guevara N., et al. Effect of surgical modality and hypofractionated split-course radiotherapy on local control and survival from sinonasal mucosal melanoma. *Clin. Oncol.* 2011; 23: 579-586.
129. Nandapalan V., Roland N., Helliwell T., Williams E., Hamilton J. and Jones A. Mucosal melanoma of the head and neck. *Clin. Otolaryngol.* 1998; 23: 107-116.
130. Amit M., Tam S., Abdelmeguid A., Kupferman M., Su S., Raza S., et al. Role of adjuvant treatment in sinonasal mucosal melanoma. *J. Neurol. Surg. B.* 2017; 78: 512-518.
131. Moya-Plana A., Auperin A., Obongo R., Baglin A., Ferrand F., Baujat B., et al. Oncologic outcomes, prognostic factor analysis and therapeutic algorithm evaluation of head and neck mucosal melanomas in France. *Eur. J. Cancer.* 2019; 123: 1-10.
132. Khan M., Kanumuri V., Raikundalia M., Vazquez A., Govindaraj S., Baredes S., et al. Sinonasal melanoma: Survival and prognostic implications based on site of involvement. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2014; 4: 151-155.
133. Sarac E., Amaral T., Leiter U. and Garbe C. Prognostic factors in 161 patients with mucosal melanoma: a study of German Central Malignant Melanoma Registry. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 2020; 34: 2021-2025.
134. Sugiyama V., Chan J., Shin J., Berek J., Osann K. and Kapp D. Vulvar melanoma. A multivariable analysis of 644 patients. *Obstet. Gynecol.* 2007; 110: 296-301.
135. López F., Llorente JL., García-Inclán C., Alonso-Guervós M., Cuesta MP., Fresno M., et al. Genomic profiling of sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011; 33: 145-153.
136. Sánchez-Fernández P., Riobello C., Costales M., Vivanco B., Cabal V., Gacriá-Marin R., et al. Next-generation sequencing for identification of actionable gene mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Sci. Rep.* 2021; 11: 1-10.
137. García-Inclan C., López F., Pérez-Escuredo J., Cuesta MP., Vivanco B., Centeno I., et al. GFR status and KRAS/BRAF mutations in intestinal-type

- sinonasal adenocarcinomas. *Cell Oncol.* 2012; 35: 443-450.
138. Dienstmann R., Dong F., Borger D., Dias-Santagata D., Ellisen L., Le L., et al. Standardized decision support in NGS reports of somatic cancer variants. *Mol. Oncol.* 2014; 8: 859-873.
139. Den Dunnen J., Dalglish R., Maglott D., Hart R., Greenblatt M., McGowan-Jordan J., et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum. Mutat.* 2016; 37: 564-569.
140. Robin X., Turck N., Hainard A., Tiberti N., Lisacek F., Sanchez JC., et al. pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curve. *BMC Bioinformatics.* 2011; 77.
141. López-Ratón M., Rodríguez-Álvarez C., Cadarso-Suárez C. and Gude-Sampedro F. OptimalCutpoints: an R package for selecting optimal cutpoints in diagnostic tests. *J. Stat. Softw.* 2014; 61: 1-36.
142. Therneau T. and Grambsch P. Modeling survival data: extending the cox model. 2000.
143. Otsuka M., Sugihara S., Mori S., Hamada K., Sasaki Y., Yoshikawa S., et al. Immune-related adverse events correlate with improved survival in patients with advanced mucosal melanoma treated with nivolumab: A single-center retrospective study in Japan. *J. Dermatol.* 2020; 47: 356-362.
144. Chang A., Karnell L. and Menck H. The national cancer data base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade. *Cancer.* 1998; 83: 1664-1678.
145. Postow M., Hamid O. and Carvajal R. Mucosal melanoma: pathogenesis, clinical behavior, and management. *Curr. Oncol. Rep.* 2012; 14: 441-448.
146. Gal T., Silver N. and Huang B. Demographics and treatment trends in sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope.* 2011; 121: 2026-2033.
147. Tacastacas J., Bray J., Cohen Y., Arbesman J., Kim J., Koon H., et al. Update on primary mucosal melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2014; 71: 366-375.
148. Lundberg M., Haapaniemi A., Hagström J., Juteau S., Hernberg M., Mäkitie A., et al. Similar survival outcome after endoscopic and open approaches for sinonasal mucosal melanoma. *Rhinology.* 2019; 57: 132-138.

149. Roth T., Gengler C., Huber G. and Holzmann D. Outcome of sinonasal melanoma: clinical experience and review of the literature. *Head Neck*. 2010; 32: 1385-1392.
150. Kuhn F., Hüllner M., Mader C., Kastrinidis N., Huber G., Von Schulthess G., et al. Contrast-enhanced PET/MR imaging versus contrast-enhanced PET/CT in head and neck cancer: how much mr information is needed. *J. Nucl. Med*. 2014; 55: 551-558.
151. Sato S., Kato J., Sawada M., Horimoto K., Okura M., Hida T., et al. Usefulness of neuron-specific enolase as a serum marker of metastatic melanoma. *J. Dermatol*. 2020; 47: 1141-1148.
152. Oguri H., Izumiya C., Maeda N., Fukaya T., Moriki T. A primary amelanotic melanoma of the vagina, diagnosed by immunohistochemical staining with HMB-45, which recurred as a pigmented melanoma. *J. Clin. Pathol*. 2004; 57: 986-988.
153. Yu C., Chen H., Liu C., Jeng Y., Wang J., Wang Y., et al. HMB-45 may be a more sensitive maker than S-100 or Melan-A for immunohistochemical diagnosis of primary oral and nasal mucosal melanomas. *J. Oral. Pathol. Med*. 2005; 34: 540-545.
154. Pfister D., Spencer S., Adelstein D., Adkins D., Brizel D., Bruce J., et al. NCCN Guidelines. Head and Neck cancers. Version 1.2021.
155. Almutuawa D., Strohl M., Gruss C., Van Zante A., Yom S., McDermott M., et al. Outcomes of sinonasal mucosal melanomas with endoscopic and open resection: a retrospective cohort study. *J. Neurooncol*. 2020; 150: 387-392.
156. Sayed Z., Migliacci J., Cracchiolo J., Barker C., Lee N., McBride S., et al. Association of surgical approach and margin status with oncologic outcomes following gross total resection for sinonasal melanoma. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2017; 143: 1220-1227.
157. Diaz JP., Rodrigo JP., Llorente JL. And Suárez C. Melanomas mucosos rinosinuales. Revisión de 17 casos. *Acta Otorrinolaringologica Española*. 2008; 59: 489-493.
158. Ledderose G. and Leunig A. Surgical management of recurrent sinonasal mucosal melanoma: endoscopic or transfacial resection. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*. 2015; 272: 351-356.

159. Torabi S., Benchetrit L., Spock T., Cheraghlou S. and Judson B. Clinically node-negative head and neck mucosal melanoma: An analysis of current treatment guidelines & outcomes. *Oral Oncol.* 2019; 92: 67-76.
160. Marinova L., Yordanov K. and Sapundgiev N. Primary mucosal sinonasal melanoma-case report and review of the literature. The role of complex treatment-surgery and adjuvant radiotherapy. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* 2011; 16: 40-43.
161. Hu R. and Yang B. Surgery alone versus post-operative radiotherapy for sinonasal malignant melanoma: a meta-analysis. *J. Laryngol. Otol.* 2018; 132: 1051-1060.
162. Grant-Freemantle M., Lane B. and Clover A. The effectiveness of radiotherapy in the treatment of head and neck mucosal melanoma: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2021; 43: 323-333.
163. Ajmani G., Liederbach E., Kyrillos A., Wang C., Pinto J. and Bhayani M. Adjuvant radiation and survival following surgical resection of sinonasal melanoma. *Am. J. Otolaryngol. Head Neck Med. Surg.* 2017; 38: 663-667.
164. Amit M., Tam S., Abdelmeguid A., Roberts D., Raza S., Su S., et al. Approaches to regional lymph node metastasis in patients with head and neck mucosal melanoma. *Cancer.* 2018; 124: 514-520.
165. Bachar G., Loh K., O'Sullivan B., Goldstein D., Wood S., Brown D., et al. Mucosal melanomas of the head and neck: the Princess Margaret Hospital experience. *Head Neck.* 2008; 30: 1325-1331.
166. Kim K., Sanguino A., Hodges C., Papadopoulos N., Eton O., Camacho L., et al. Approaches to regional lymph node metastasis in patients with head and neck mucosal melanoma. *Cancer.* 2004; 100: 1478-1483.
167. Ives N., Stowe R., Lorigan P. and Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 5426-5434.
168. Bedikian A., Johnson M., Warneke C., Papadopoulos N., Kim K., Hwu W., et al. Prognostic factors that determine the long-term survival of patients with unresectable metastatic melanoma. *Cancer Invest.* 2008; 26: 624-633.

169. Omata W., Tsutsumida A., Namikawa K., Takahashi A., Oashi K. and Yamazaki N. Sequential combination chemotherapy of dacarbazine (DTIC) with carboplatin and paclitaxel for patients with metastatic mucosal melanoma of nasal cavity and paranasal sinuses. *Clin. Med. Insights Case Reports*. 2017; 10: 1-5.
170. Labelle M. and Hynes R. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov*. 2012; 2: 1091-1099.
171. Takayasu Y., Kubo N., Shino M., Nikkuni O., Ida S., Musha A., et al. Carbon-ion radiotherapy combined with chemotherapy for head and neck mucosal melanoma: Prospective observational study. *Cancer*. 2019; 8: 7227-7235.
172. Koto M., Demizu Y., Saitoh J., Suefuji H., Tsuji H., Okimoto T., et al. Multicenter Study of Carbon-Ion Radiation Therapy for Mucosal Melanoma of the Head and Neck: Subanalysis of the Japan Carbon-Ion Radiation Oncology Study Group (J-CROS) Study (1402 HN). *Int. j. Radiation Oncol. Biol. Phys.* 2017; 97: 1054-1060.
173. Amit M., Tam S., Abdelmeguid A., Kupferman M., Su S., Raza S., et al. Patterns of treatment failure in patients with sinonasal mucosal melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2018; 25: 1723-1729.
174. Chlopek M., Lasota J., Thompson L., Szczepaniak M., Kuzniacka A., Hincza K., et al. Alterations in key signaling pathways in sinonasal tract melanoma. A molecular genetics and immunohistochemical study of 90 cases and comprehensive review of the literature. *Mod. Pathol.* 2022; 35: 1609-1617.
175. Öztürk S., Yilmaz I., Taskin O., Narli G., Sen F., Çomoglu S., et al. BRAF, NRAS, KIT, TERT, GNAQ/GNA11 mutation profile analysis of head and neck mucosal melanomas: a study of 42 cases. *Pathology*. 2017; 49: 55-61.
176. Cirenajwis H., Lauss M., Ekedahl H., Törngren T., Kvist A., Saal L., et al. NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics. *Mol. Oncol.* 2017; 11: 438-451.
177. Conway J., Dietlein F., Taylor-Weiner A., AlDubayan S., Vokes N., Keenan T., et al. Integrated molecular drivers coordinate biological and clinical states in melanoma. *Nat. Genet.* 2020; 52: 1373-1383.

178. Hayward N., Wilmott J., Waddell N., Johansson P., Field M., Nones., et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017; 545: 175-180.
179. Krauthammer M., Kong Y., Bacchiocchi A., Evans P., Pornputtpong N., McCusker J., et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat. Genet.* 2015; 47: 996-1002.
180. Colombino M., Lissia A., Franco R., Botti G., Ascierto P., Manca A., et al. Unexpected distribution of cKIT and BRAF mutations among Southern Italian patients with sinonasal melanoma. *Dermatology*. 2013; 226: 279-284.
181. Zhou R., Shi C., Tao W., Li W., Wu J., Han Y., et al. Analysis of mucosal melanoma whole-genome landscapes reveals clinically relevant genomic aberration. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25: 3548-3560.
182. Newell F., Kong Y., Wilmott J., Johansson P., Ferguson P., Cui C., et al. Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. *Nat. Commun.* 2019; 10.
183. Scholz S., Cosgarea I., Sübkind D., Murali R., Möller I., Reis H., et al. NF1 mutations in conjunctival melanoma. *Br. J. Cancer.* 2018; 118: 1243-1247.
184. Tsipi M., Poulou M., Fylaktou E., Kosma K., Tsoutsou E., Pons M., et al. Phenotypic expression of a spectrum of Neurofibromatosis Type 1 (NF1) mutations identified through NGS and MLPA. *J. Neurol. Sci.* 2018; 395: 95-105.
185. Kehrer-Sawatzki H. and Cooper D. Classification of NF1 microdeletions and its importance for establishing genotype/phenotype correlations in patients with NF1 microdeletions. *Hum. Genet.* 2021; 140: 1635-1649.
186. Kehrer-Sawatzki H., Wahlländer U., Cooper D. and Mautner V. Atypical nf1 microdeletions: Challenges and opportunities for genotype/phenotype correlations in patients with large NF1 deletion. *Genes.* 2021; 12.
187. Büki G., Zsigmond A., Czako M., Szalai R., Antal G., Farkas V., et al. Genotype-phenotype associations in patients with type-1, type-2, and atypical NF1 microdeletions. *Front. Genet.* 2021; 12.
188. Sekine S., Nakanishi Y., Ogawa R., Kouda S. and Kanai Y. Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites. *Virchows Arch.* 2009; 454: 513-517.

189. Bai X., Kong Y., Chi Z., Sheng X., Chi C., Wang X., et al. MAPK pathway and TERT promoter gene mutation pattern and its prognostic value in melanoma patients: A retrospective study of 2,793 cases. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23: 6120-6127.
190. Chapman P., Hauschild A., Robert C., Haanen J., Ascierto P., Larkin J., et al. Improved survival with Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 2507-2516.
191. Houben R., Vetter-Kauczok C., Ortmann S., Rapp U., Broecker E. and Becker J. Phospho-ERK staining is a poor indicator of the mutational status of BRAF and NRAS in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2008; 128: 2003-2012.
192. Dowsett M., Nielsen T., A'Hern R., Bartlett J., Coombes C., Cuzick J., et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011; 103: 1656-1664.
193. Ikenberg H., Bergeron C., Schmidt D., Griesser H., Alameda F., Angeloni C., et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2013; 105: 1550-1557.
194. Wandler A., Spaun E., Steiniche T. and Nielsen P. Automated quantification of Ki67/MART1 stains may prevent false-negative melanoma diagnoses. *J. Cutan. Pathol.* 2016; 43: 956-962.
195. Yin G., Guo W., Liu H., Huang Z. and Chen X. Ki-67 and p53 expression in head and neck mucosal melanoma: A clinicopathologic analysis of predictors of outcome. *Ann. Diagn. Pathol.* 2021; 54.
196. Ma X., Wu Y., Zhang T., Song H., Jv H., Guo W., et al. Ki67 proliferation index as a histopathological predictive and prognostic parameter of oral mucosal melanoma in patients without distant metastases. *J. Cancer.* 2017; 8: 3828-3837.
197. Lee S., Roh M., Kang B., Park K., Kim S., Lee S., et al. PTEN methylation dependent sinonasal mucosal melanoma. *Cancer Res. Treat.* 2016; 48: 853-858.
198. Huang Y., Wei L., Huang Y., Wen S., Liu T., Duan X., et al. Identification of distinct genomic features reveals frequent somatic AHNK and PTEN mutations predominantly in primary malignant melanoma presenting in the ureter. *Jap. J. Clin. Oncol.* 2022; 52: 930-943.

199. Wang K., Ji W., Yu Y., Li Z., Niu X., Xia W., et al. FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial–mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer. *Oncogene*. 2018; 37: 5340-5354.
200. Xerri L., Battyani Z., Grob J., Parc P., Hassoun J., Bonerandi J., et al. Expression of FGF1 and FGFR1 in human melanoma tissues. *Mel. Res.* 1996; 6: 223-230.
201. Lefevre G., Bahchia N., Calipel A., Mouriaux F., Faussat A., Mrzyk S., et al. Activation of the FGF2/FGFR1 autocrine loop for cell proliferation and survival in uveal melanoma cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50: 1047-1057.
202. Schröck A., Göke F., Wagner P., Bode M., Franzen A., Huss S., et al. Fibroblast growth factor receptor-1 as a potential therapeutic target in sinonasal cancer. *Head Neck*. 2014; 36: 1253-1257.
203. Brown N., Plouffe K., Yilmaz O., Weindorf S., Betz B., Carey T., et al. P53 mutations and CDKN2A mutations/deletions are highly recurrent molecular alterations in the malignant progression of sinonasal papillomas. *Mod. Pathol.* 2021; 34: 1133-1142.
204. Hauschild A., Grob JJ., Demidov L., Javary T., Gutzmer R., Millward M., et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012; 380: 358-365.
205. Kulkarni A., Al-Hraishawi H., Simhadri S., Hirshfield K., Chen S., Pine S., et al. BRAF fusion as a novel mechanism of acquired resistance to vemurafenib in BRAFV600E mutant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23: 5631-5638.
206. Pópulo H., Lopes JM. And Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 1886-1918.
207. Zhang Z., Richmond A. and Yan C. Immunomodulatory properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK inhibition augment response to immune checkpoint blockade in melanoma and triple-negative breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 7353-7366.
208. Hodi S., Corless C., Giobbie-Hurder A., Fletcher J., Zhu M., Marino-Enriquez 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: 3182-3190.

209. Carvajal R., Lawrence D., Weber J., Gajewski T., Gonzalez R., Lutzky J., et al. Phase II study of Nilotinib in melanoma harboring KIT alterations following progression to prior KIT inhibition. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21: 2289-2296.
210. Guo J., Kong Y., Flaherty K., Xu X., Zhu Y., Corless C., et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 2904-2909.
211. Lee S., Kim T., Kim Y., Jang K., Lee H., Lee S., et al. Phase II trial of Nilotinib in patients with metastatic malignant melanoma harboring KIT gene aberration: a multicenter trial of Korean Cancer Study Group (UN10-06). *Oncologist.* 2015; 20: 1312-1319.
212. Quintás-Cardama A., Lazar A., Woodman S., Kim K., Ross M., Hwu P. Complete response of stage IV anal mucosal melanoma expressing KIT Val560Asp to the multikinase inhibitor sorafenib. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2008; 5: 737-740.
213. Carvajal R., Antonescu C., Wolchok J., Chapman P., Roman R., Teitcher J., et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA.* 2011; 305: 2327-2334.
214. Ma X., Wu Y., Zhang T., Song H., Jv H., Guo W., et al. The clinical significance of c-Kit mutations in metastatic oral mucosal melanoma in China patient characteristics. *Oncotarget.* 2017; 8: 82661-82673.
215. Coutts K., Bemis J., Turner J., Bagby S., Murphy D., Christiansen J., et al. ALK inhibitor response in melanomas expressing EML4-ALK fusions and alternate ALK isoforms. *Mol. Cancer Ther.* 2018; 17: 222-231.
216. Postow M., Luke J., Bluth M., Ramaiya N., Panageas K., Lawrence D., et al. Ipilimumab for patients with advanced mucosal melanoma. *Oncologist.* 2013; 18: 726-732.
217. Moya-Plana A., Herrera R., Rossoni C., Dercle L., Ammari S., Girault I., et al. Evaluation of the efficacy of immunotherapy for non-resectable mucosal melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 2019; 68: 1171-1178.
218. Hodi S., O'Day S., McDermott D., Weber R., Sosman J., Haanen J., et al. Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 711-723.

219. Del Vecchio M., Di Guardo L., Ascierto P., Grimaldi A., Chiarion V., Pigozzo J., et al. Efficacy and safety of ipilimumab 3 mg/kg in patients with pretreated, metastatic, mucosal melanoma. *Eur. J. Cancer.* 2014; 50: 121-127.
220. Gellrich F., Schmitz M., Beisert S. and Meier F. Anti-PD-1 and novel combinations in the treatment of melanoma. An update. *J. Clin. Med.* 2020; 14.
221. Weber J., Mandala M., Del Vecchio M., Gogas H., Arance A., Cowey C., et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in resected stage III or IV melanoma. *N. Eng. J. Med.* 2017; 377: 1824-1835.
222. Eggermont A., Blank C., Mandala M., Long G., Atkinson V., Dalle S., et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in resected stage III melanoma. *N. Eng. J. Med.* 2018; 378: 1789-1801.
223. Schachter J., Ribas A., Long G., Arance A., Grob JJ., Mortier L., et al. pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet.* 2017; 390: 1853-1862.
224. Hodi F., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J., Rutkowski P., Lance C., et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018; 19: 1480-1492.
225. Larkin J., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J., Rutkowski P., Lao C., et al. Five-year survival with combined Nivolumab and Ipilimumab in advanced melanoma. *N. Eng. J. Med.* 2019; 381: 1535-1546.
226. Wolchok JD., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Rutkowski P., Grob J., Cowey C., et al. Nivolumab versus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma. *N. Eng. J. Med.* 2017; 377: 1345-1356.
227. Freeman-Keller M., Kim Y., Cronin H., Richards A., Gibney G. and Weber J. Nivolumab in resected and unresectable metastatic melanoma: characteristics of immune-related adverse events and association with outcomes. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22: 886-894.

228. Okada N., Kawazoe H., Takechi K., Matsudate Y., Utsunomiya R., Zamami Y., et al. Association between immune-related adverse events and clinical efficacy in patients with melanoma treated with nivolumab: a multicenter retrospective study. *Clin. Ther.* 2018; 41: 59-67.
229. D'Angelo S., Larking J., Sosman J., Lebbé C., Brady B., Neyns B., et al. Efficacy and safety of nivolumab alone or in combination with ipilimumab in patients with mucosal melanoma: a pooled analysis. *J. Clin. Oncol.* 2017; 35: 226-235.
230. Mignard C., Deschamps A., Gillibert A., Benedicte A., Dutriaux C., Khammari A., et al. Efficacy of immunotherapy in patients with metastatic mucosal or uveal melanoma. *J. Oncol.* 2018
231. Hanahan D. and Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646-674.
232. Rodrigo JP., Sánchez-Canteli M., López F., Wolf G., Hernández-Prera J., Williams M., et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment of laryngeal squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Biomedicines.* 2021; 9.
233. Rodrigo JP., Sánchez-Canteli M., Triantafyllou A., De Bree R., Mäkitie A., Franchi A., et al. Neutrophil to lymphocyte ratio in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancers.* 2023; 15: 1-13.
234. García-Marín R., Reda S., Riobello C., Cabal V., Suárez-Fernández L., Vivanco B., et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes and tumour microenvironment immune types as biomarkers for immunotherapy in sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. *Vaccines.* 2020; 8: 1-10.
235. Villanueva-Fernández E., Hermsen M., Suárez-Fernández L., Vivanco B., Franchi A., García Marín R. et al. Biomarkers for immunotherapy in poorly differentiated sinonasal tumors. *Biomedicines.* 2022; 10.
236. Fu Q., Chen N., Ge C., Li R., Li Z., Zeng B., et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. 2019; 8: 1-14.

237. Sun Q., Sun H., Wu N., Cong L. and Cong X. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocyte grade in melanoma: a meta-analysis. *Dermatology*. 2020; 236: 481-492.
238. Ren Y., Lv Q., Yue W., Liu B. and Zou Z. The programmed cell death protein-1 / programmed cell death ligand 1 expression , CD3 + T cell infiltration , NY-ESO-1 expression , and microsatellite instability phenotype in primary cutaneous melanoma and mucosal melanoma and their clinical significance. *Melanoma Res*. 2020; 30: 85-101.
239. Shi L., Lei D., Ma C., Xu F., Li Y., Wang Y., et al. Clinicopathological implications of tumour-associated macrophages and vascularization in sinonasal melanoma. *J. Int. Med. Res*. 2010; 38: 1276-1286.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

9.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO 1: MODELOS DE REGRESIÓN DE COX

1-. MODELOS DE REGRESIÓN EN BASE A LA SG

Variable		Descriptivo	HR univariante	HR multivariante
Sexo	H	12 (46,2)	-	-
	M	14 (53,8)	0,70 (0,25-1,94, p=0,094)	0,67 (0,09-5,15, p=0,696)
Edad		74,4 (10,6)	1,01 (0,96-1,06, p= 0,618)	1,02 (0,95-1,09, p=0,608)
Motivo consulta	Epistaxis	14 (56,0)	0,91 (0,31-2,63, p=0,860)	0,93 (0,20-4,43, p=0,931)
	Otras	11 (44,0)	-	-
Estadio	III	8 (30,8)	-	-
	IVa	12 (46,2)	1,31 (0,44-3,87, p=0,631)	1,41 (0,30-6,57, p=0,938)
	IVb	6 (23,1)	0,59 (0,11-3,18, p=0,541)	0,91 (0,07-10,95, p=0,938)
RT	No	16 (64,0)	-	-
	Sí	9 (36,0)	0,69 (0,21-2,21, p=0,530)	0,61 (0,14-2,66, p=0,513)
Recidiva	No	6 (26,1)	-	-
	Distancia	6 (26,1)	1,44 (0,35-5,92, p=0,616)	1,94 (0,16-24,03, p=0,605)
	Otras	11 (47,8)	1,61 (0,42-6,14, p=0,487)	1,53 (0,23-10,37, p=0,661)

2-. MODELOS DE REGRESIÓN EN BASE A LA SLE

Variable		Descriptivo	HR univariante	HR multivariante
Sexo	H	12 (46,2)	-	-
	M	14 (53,8)	0,51 (0,17-1,56, p=0,238)	0,37 (0,09-1,48, p=0,161)
Edad		74,4 (10,6)	0,98 (0,92-1,05, p=0,642)	0,98 (0,89-1,07, p=0,628)
Motivo consulta	Epistaxis	14 (56,0)	1,77 (0,54-5,81, p=0,346)	1,10 (0,31-3,88, p=0,879)
	Otras	11 (44,0)	-	-
Localización	FN	17 (73,9)	1,95 (0,43-8,88, p=0,390)	1,39 (0,22-8,68, p=0,722)
	Otro	6 (26,1)	-	-
Abordaje	Abierto	10 (41,7)	-	-
	CENS	14 (58,3)	1,92 (0,62-5,96, p=0,259)	3,80 (0,44-32,97, p=0,226)
Estadio	III	8 (30,8)	-	-
	IV	18 (69,2)	0,78 (0,24-2,46, p=0,667)	1,16 (0,27-5,07, p=0,840)
RT	No	16 (64,0)	-	-
	Sí	9 (36,0)	1,47 (0,45-4,81, p=0,529)	0,43 (0,06-2,86, p=0,382)

3-. MODELOS DE REGRESIÓN EN BASE A LA SEE.

Variable		Descriptivo	HR univariante	HR multivariante
Sexo	H	12 (46,2)	-	-
	M	14 (53,8)	0,46 (0,13-1,56, p=0,211)	0,04 (0,00-2,90, p=0,141)
Edad		74,4 (10,6)	1,00 (0,94-1,06, p= 0,978)	0,98 (0,85-1,13, p=0,783)
Motivo consulta	Epistaxis	14 (56,0)	1,07 (0,30-3,82, p=0,911)	0,42 (0,02-7,66, p=0,556)
	Otras	11 (44,0)	-	-
Localización	FN	17 (73,9)	0,76 (0,16-3,75, p=0,739)	0,50 (0,05-4,76, p=0,544)
	Otro	6 (26,1)	-	-
Abordaje	Abierto	10 (41,7)	-	-
	CENS	14 (58,3)	0,79 (0,21-2,97, p=0,732)	15,39 (0,15-1607,17, p=0,249)
Estadio	III	8 (30,8)	-	-
	IV	18 (69,2)	0,99 (0,30-3,30, p=0,990)	0,66 (0,06-7,74, p=0,741)
RT	No	16 (64,0)	-	-
	Sí	9 (36,0)	1,10 (0,31-3,95, p=0,881)	0,03 (0,00-3,79, p=0,152)

9.2 MATERIAL SUPLEMENTARIO 2: ANÁLISIS DE LAS CNV

1. CASO 1 (A412-T)

Cr	Inicio	Final	Gen	N.º copias	Tipo	Región afecta	Origen
11	532575	534386	HRAS	1	LOSS	Gen (c)	Somático
11	2132972	2130359	IGF2	1	LOSS	Gen (c)	Somático
11	69641292	69651343	CCND1	1	LOSS	Gen (c)	Somático
11	108227564	108365572	ATM	1	LOSS	Gen (c)	Somático
12	56099838	56102067	ERBB3	3	GAIN	Gen (p)	Germinal
17	7669541	7676653	TP53	1	LOSS	Gen (c)	Somático
19	1206902	1226706	STK11	1	LOSS	Gen (c)	Somático
19	3094587	3121239	GNA11	1	LOSS	Gen (c)	Somático
19	4090532	4123937	MAP2K2	1	LOSS	Gen (c)	Somático
2	25234217	15314044	DNMT3A	3	GAIN	Gen (c)	Somático
3	12584453	12618737	RAF1	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	38138640	38141352	MYD88	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	41224002	31239357	CTNNB1	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	47017029	47163984	SETD2	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	52402222	52409943	BAP1	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	69739529	69965263	MITF	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	70958197	7119844	FOXP1	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	138945580	138946732	FOXL2	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	142449359	142578770	ATR	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	179198810	179234384	PIK3CA	2	LOH	Gen (c)	Somático
3	186080095	186081055	ETV5	2	LOH	Gen (c)	Somático
4	1793861	1807700	FGFR3	1	LOSS	Gen (c)	Somático
7	55019213	55205628	EFGR	1	LOSS	Gen (c)	Somático
7	81702512	81770035	HGF	1	LOSS	Gen (c)	Somático
7	92615080	92833338	CDK6	1	LOSS	Gen (c)	Somático
8	38413559	28461172	FGFR1	1	LOSS	Gen (c)	Somático
8	70052058	70069870	PRDM14	4	GAIN	Gen (c)	Somático
8	127736404	127738317	MYC	4	GAIN	Gen (c)	Somático

2. CASO A241-T

Cr	Inicio	Final	Gen	N.º copias	Tipo	Región afecta	Origen
19	1206902	1226706	STK11	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	3094587	3121239	GNA11	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	4090532	4123937	MAP2K2	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	15160647	15200980	NOTCH3	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	15238314	15273112	BRD4	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	17826682	17844481	JAK3	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	18155860	18169310	PIK3R2	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	29812494	29823835	CCNE1	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	35718007	35738575	KMT2B	2	LOH	Gen (c)	Somático
19	45409615	45423441	ERCC1	2	LOH	Gen (c)	Somático
2	211383597	212438597	ERBB4	1	LOSS	Gen (c)	Somático
3	47017029	47163984	SETD2	1	LOSS	Gen (c)	Somático
6	117288478	117425714	ROS1	1	LOSS	Gen (c)	Somático
6	151807898	152125414	ESR1	1	LOSS	Gen (c)	Somático
8	70052058	70069870	PRDM14	3	GAIN	Gen (c)	Somático
9	95446314	95462058	PTCH1	3	GAIN	Gen (c)	Somático
9	1328996218	132928939	TSC1	3	GAIN	Gen (c)	Somático
9	136496058	136545851	NOTCH1	3	GAIN	Gen (c)	Somático

3. CASO 7 (A460 T)

Cr	Inicio	Final	Gen	N.º copias	Tipo	Región afecta	Origen
12	68808412	68839861	MDM2	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
12	102402440	102480445	IGF1	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
15	90084201	90102342	IDH2	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	1206902	1226706	STK11	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	3094587	3121239	GNA11	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	4090532	4123937	MAP2K2	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	15160647	15200980	NOTCH3	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	15238314	15273112	BRD4	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	17826682	17844481	JAK3	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	18155860	18169310	PIK3R2	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
19	29812494	29823835	CCN31	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
3	179198810	179234384	PIK3CA	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
6	117288478	117425714	ROS1	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
9	95446314	95516841	PTCH1	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido
9	132896218	132928939	TSC1	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
9	136496058	136545851	NOTCH1	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido

4. CASO 8 (A629 T)

Cr	Inicio	Final	Gen	N.º copias	Tipo	Región afecta	Origen
10	43077198	43128334	RET	1	LOSS	Gen (c)	Somático
10	87864400	87965535	PTEN	1	LOSS	Gen (c)	Somático
10	102395897	102402445	NFKB2	1	LOSS	Gen (c)	Somático
10	121379517	121593882	FGFR2	1	LOSS	Gen (c)	Somático
10	129467147	129767012	MGMT	1	LOSS	Gen (c)	Somático
12	57748462	57751728	CDK4	3	GAIN	Gen (c)	Somático
19	1206902	1226706	STK11	1	LOSS	Gen (c)	Somático
19	3094587	3121239	GNA11	1	LOSS	Gen (c)	Somático
19	4090532	4123937	MAP2K2	1	LOSS	Gen (c)	Somático
19	15160647	15200980	NOTCH3	1	LOSS	Gen (c)	Somático
19	15238314	15273112	BRD4	1	LOSS	Gen (c)	Somático
4	54657951	54738624	KIT	3	GAIN	Gen (c)	Somático
6	117288478	117425714	ROS1	1	LOSS	Gen (c)	Somático
6	151807898	152125414	ESR1	1	LOSS	Gen (c)	Somático
7	116695693	116796137	MET	3	GAIN	Gen (c)	Somático
8	70052058	70069870	PRDM14	3	GAIN	Gen (c)	Somático

5. CASO 9 (A362)

Cr	Inicio	Final	Gen	N.º copias	Tipo	Región afecta	Origen
2	63053146	63056328	OTX1	4	GAIN	Gen ©	Somático

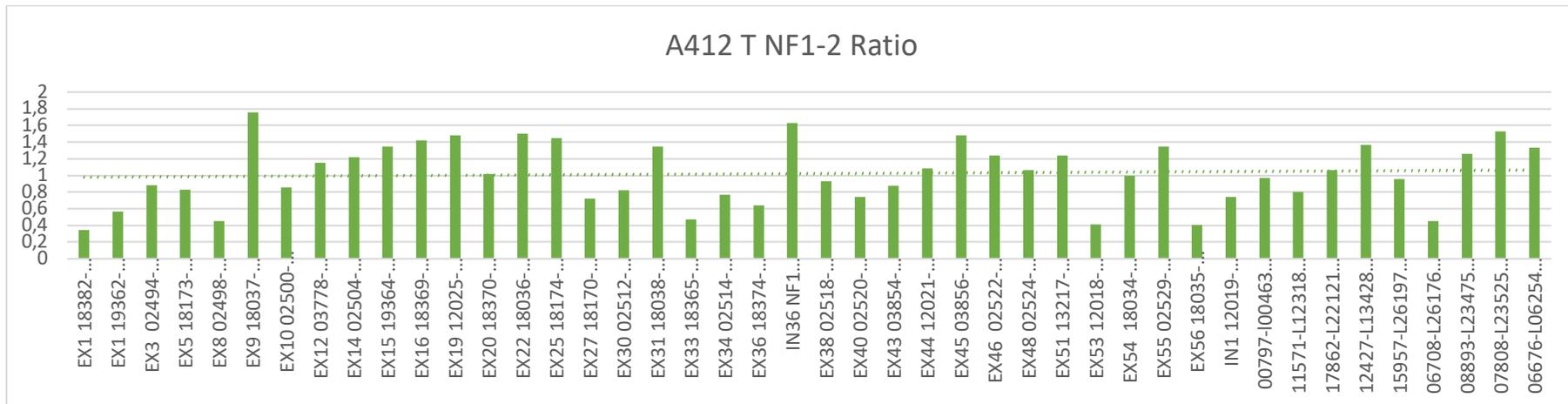
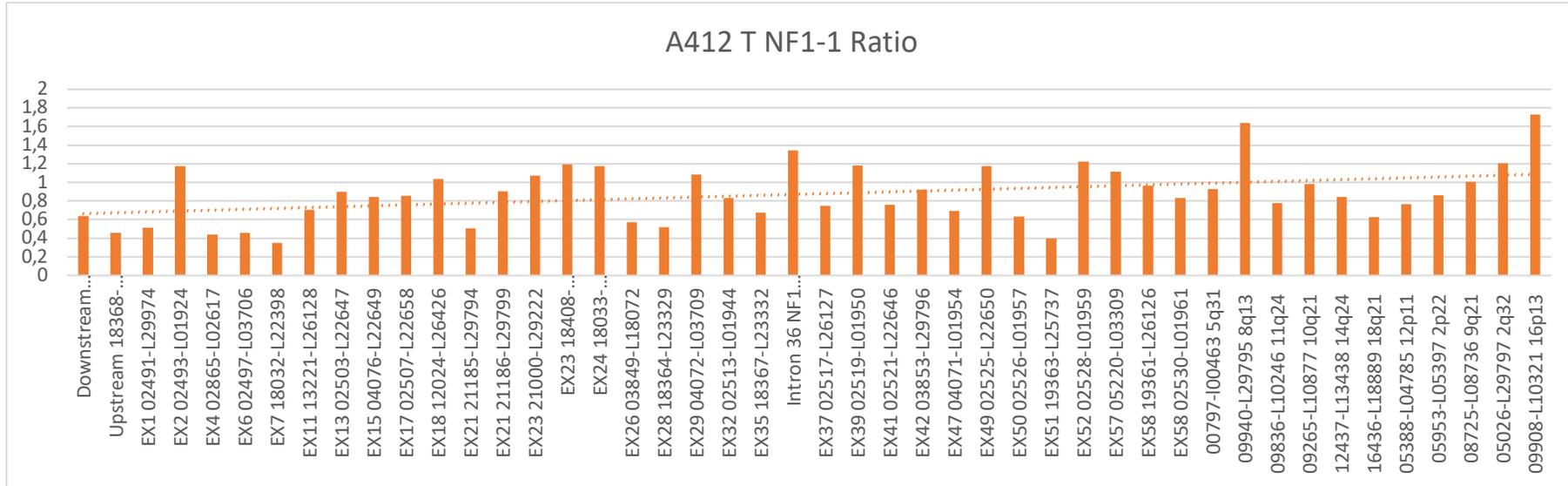
CASO 10 (A278-T)

Cr	Inicio	Final	Gen	N.º copias	Tipo	Región afecta	Origen
6	117288478	117425714	ROS1	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
6	151807898	152125414	ESR1	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
7	81702512	81770035	HGF	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
7	92615080	92833338	CDK6	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
7	116695693	116796137	MET	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
7	129189136	129212465	SMO	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
7	140726432	140924766	BRAF	1	LOSS	Gen (c)	Desconocido
8	38413559	38461172	FGFR1	3	GAIN	Gen (c)	Desconocido

9.3 MATERIAL SUPLEMENTARIO 3: ANÁLISIS MLPA.

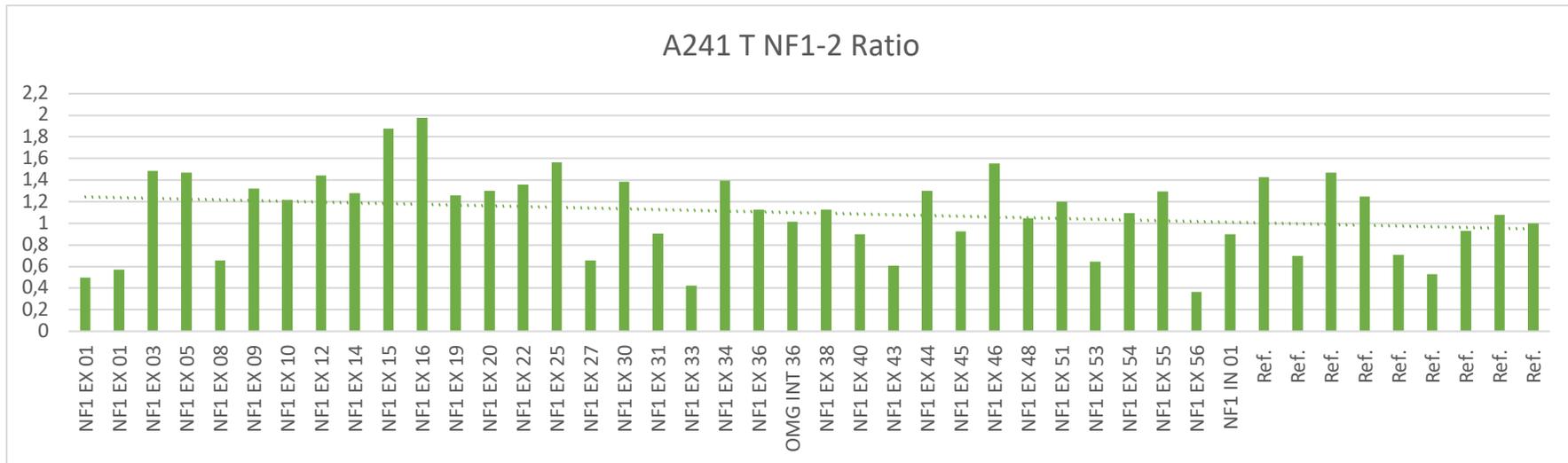
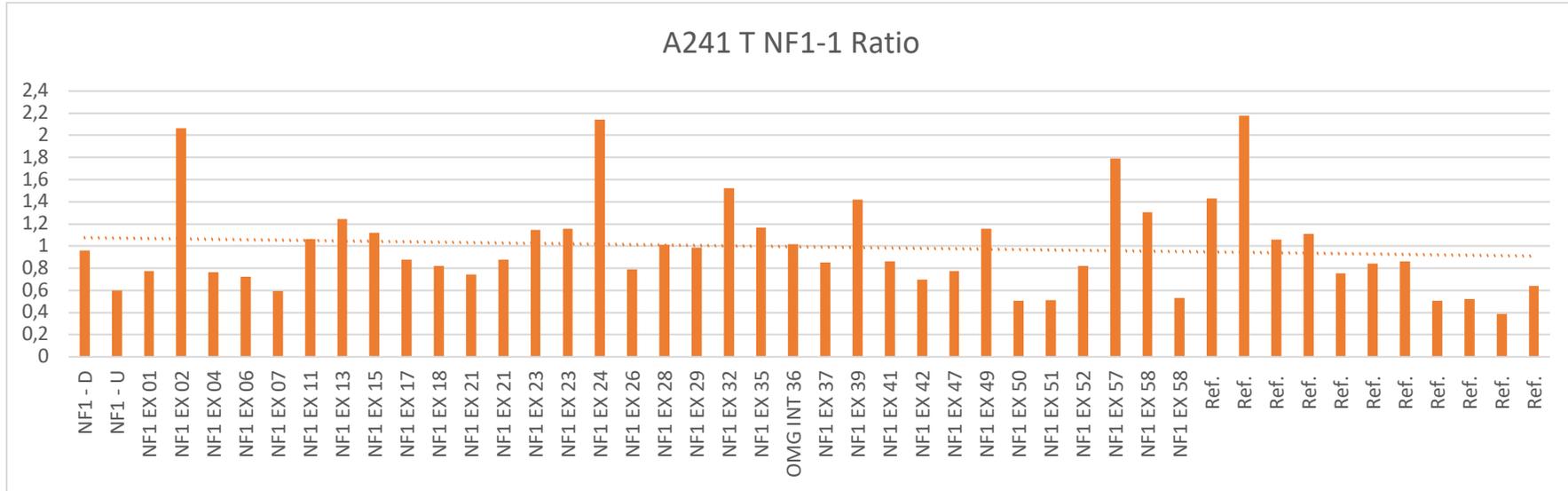
1. CASO 1 (MUESTRA A412 T)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	0,63705057	NF1 EX 01	0,346072312
NF1 - U	0,457772879	NF1 EX 01	0,56953877
NF1 EX 01	0,510073643	NF1 EX 03	0,881139825
NF1 EX 02	1,175743177	NF1 EX 05	0,831227567
NF1 EX 04	0,441277322	NF1 EX 08	0,454036759
NF1 EX 06	0,457961283	NF1 EX 09	1,758301791
NF1 EX 07	0,348284616	NF1 EX 10	0,858074486
NF1 EX 11	0,705997762	NF1 EX 12	1,152316486
NF1 EX 13	0,899544706	NF1 EX 14	1,216178061
NF1 EX 15	0,845064648	NF1 EX 15	1,348026917
NF1 EX 17	0,852439286	NF1 EX 16	1,418245861
NF1 EX 18	1,033971509	NF1 EX 19	1,48417592
NF1 EX 21	0,504416125	NF1 EX 20	1,018415744
NF1 EX 21	0,906086115	NF1 EX 22	1,503431085
NF1 EX 23	1,069746912	NF1 EX 25	1,447879047
NF1 EX 23	1,192231922	NF1 EX 27	0,721660913
NF1 EX 24	1,172315929	NF1 EX 30	0,821724517
NF1 EX 26	0,573735991	NF1 EX 31	1,344223509
NF1 EX 28	0,515768723	NF1 EX 33	0,469782523
NF1 EX 29	1,087264773	NF1 EX 34	0,766997797
NF1 EX 32	0,832482234	NF1 EX 36	0,638473691
NF1 EX 35	0,671887582	OMG INT 36	1,63148697
OMG INT 36	1,346176383	NF1 EX 38	0,928248174
NF1 EX 37	0,745157159	NF1 EX 40	0,742021218
NF1 EX 39	1,179825468	NF1 EX 43	0,872963391
NF1 EX 41	0,76077762	NF1 EX 44	1,085512963
NF1 EX 42	0,924479127	NF1 EX 45	1,482633896
NF1 EX 47	0,690390186	NF1 EX 46	1,239078428
NF1 EX 49	1,175908993	NF1 EX 48	1,06262918
NF1 EX 50	0,632029483	NF1 EX 51	1,237521647
NF1 EX 51	0,400556733	NF1 EX 53	0,411551467
NF1 EX 52	1,223116493	NF1 EX 54	0,994532591
NF1 EX 57	1,114778885	NF1 EX 55	1,349998393
NF1 EX 58	0,964724451	NF1 EX 56	0,405191999
NF1 EX 58	0,830610179	NF1 IN 01	0,740638992



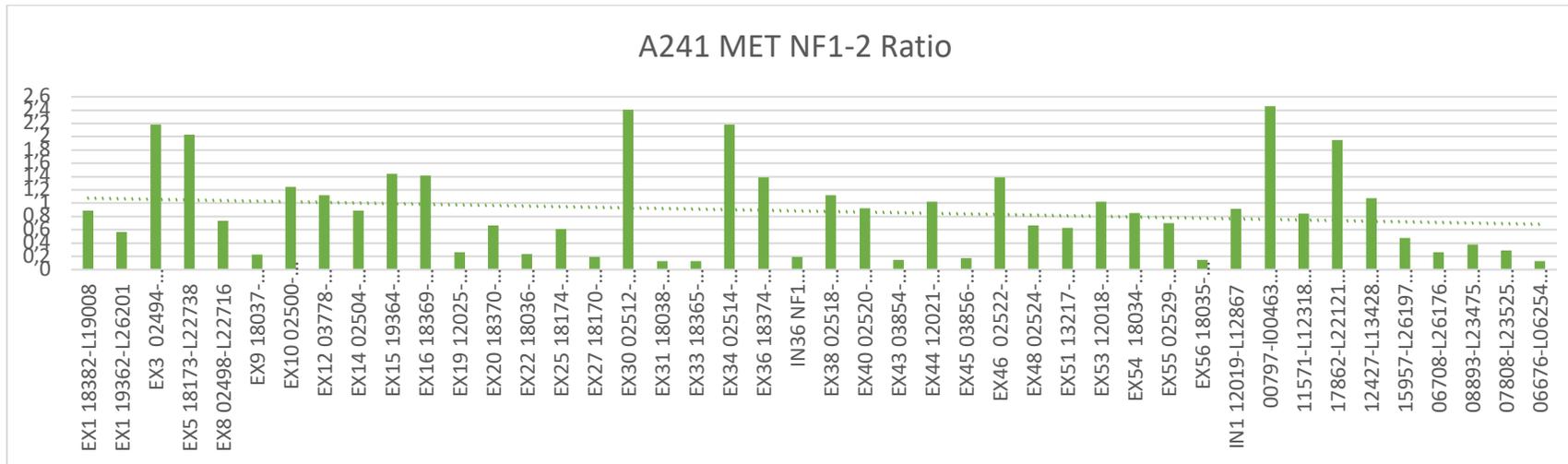
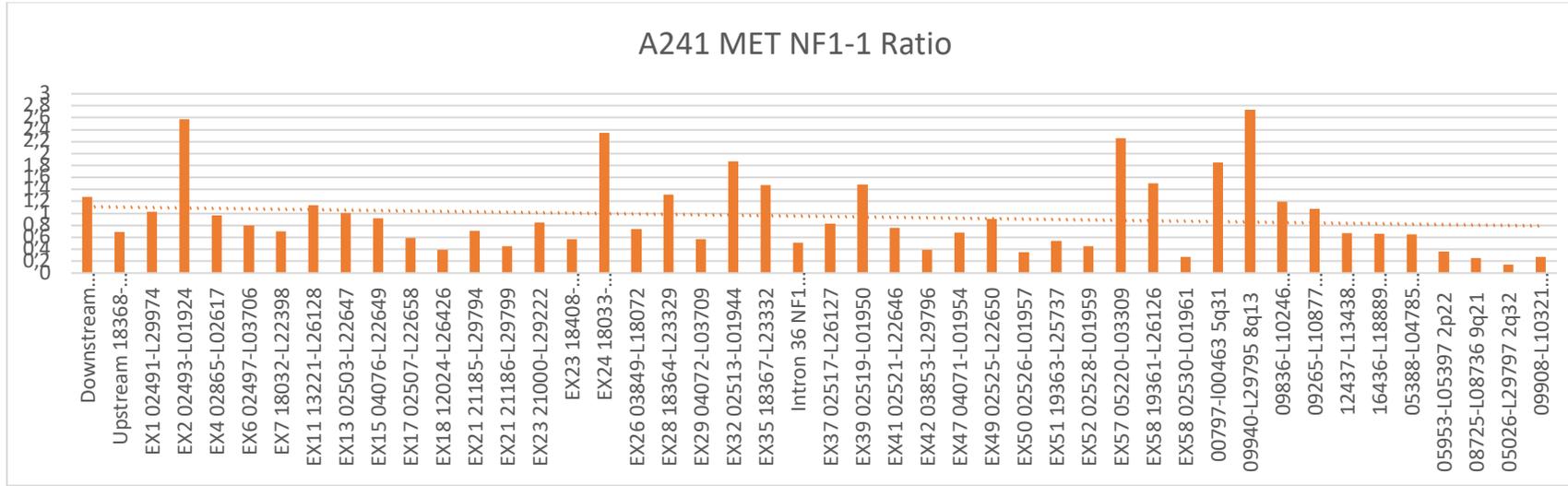
2. CASO 2 (MUESTRA A241 T)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	0,958017513	NF1 EX 01	0,497606631
NF1 - U	0,600363312	NF1 EX 01	0,573532938
NF1 EX 01	0,774100647	NF1 EX 03	1,487301901
NF1 EX 02	2,062977452	NF1 EX 05	1,471835023
NF1 EX 04	0,764310652	NF1 EX 08	0,654353443
NF1 EX 06	0,720637673	NF1 EX 09	1,322740698
NF1 EX 07	0,591842178	NF1 EX 10	1,215001131
NF1 EX 11	1,064944726	NF1 EX 12	1,441814602
NF1 EX 13	1,242815269	NF1 EX 14	1,281114455
NF1 EX 15	1,119015567	NF1 EX 15	1,876579068
NF1 EX 17	0,876163472	NF1 EX 16	1,975867255
NF1 EX 18	0,818846887	NF1 EX 19	1,258537691
NF1 EX 21	0,744025083	NF1 EX 20	1,298077042
NF1 EX 21	0,878600807	NF1 EX 22	1,359396096
NF1 EX 23	1,147041392	NF1 EX 25	1,562369209
NF1 EX 23	1,156011399	NF1 EX 27	0,65334991
NF1 EX 24	2,144152906	NF1 EX 30	1,382683272
NF1 EX 26	0,79048446	NF1 EX 31	0,905094694
NF1 EX 28	1,010773586	NF1 EX 33	0,423016163
NF1 EX 29	0,983890849	NF1 EX 34	1,396602648
NF1 EX 32	1,523771557	NF1 EX 36	1,127070001
NF1 EX 35	1,165440174	OMG INT 36	1,017379526
OMG INT 36	1,01796872	NF1 EX 38	1,125262843
NF1 EX 37	0,853904858	NF1 EX 40	0,898451928
NF1 EX 39	1,421459229	NF1 EX 43	0,608341649
NF1 EX 41	0,862423682	NF1 EX 44	1,298378355
NF1 EX 42	0,696328635	NF1 EX 45	0,924580282
NF1 EX 47	0,774321415	NF1 EX 46	1,553131183
NF1 EX 49	1,157252975	NF1 EX 48	1,048167954
NF1 EX 50	0,50442823	NF1 EX 51	1,201553374
NF1 EX 51	0,510636788	NF1 EX 53	0,646892297
NF1 EX 52	0,821648653	NF1 EX 54	1,093973026
NF1 EX 57	1,792961093	NF1 EX 55	1,295619919
NF1 EX 58	1,304434713	NF1 EX 56	0,362881482
NF1 EX 58	0,530020652	NF1 IN 01	0,897544561



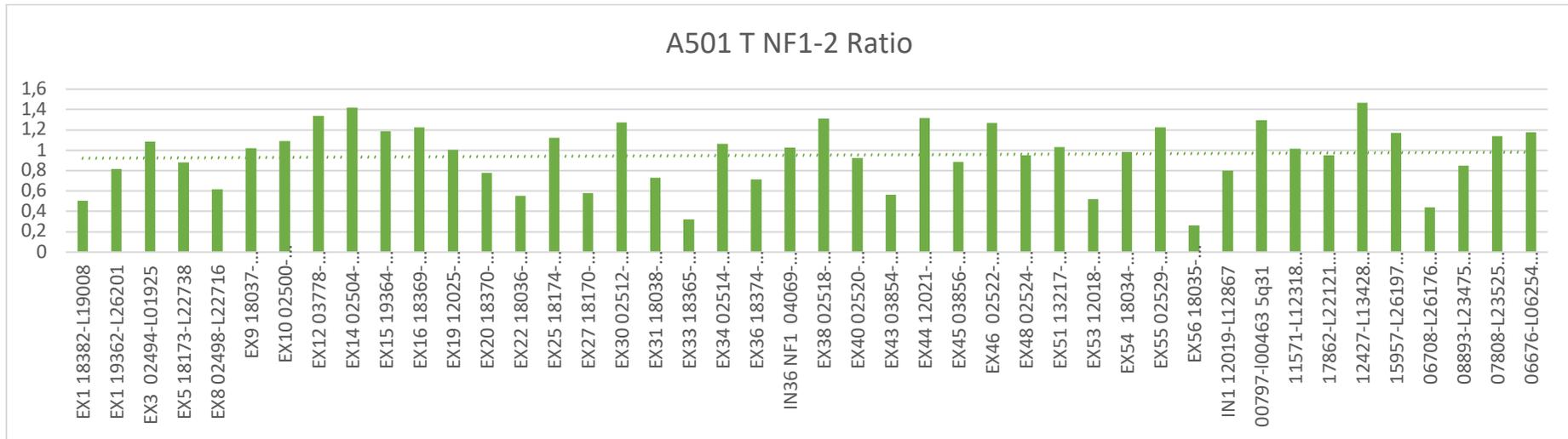
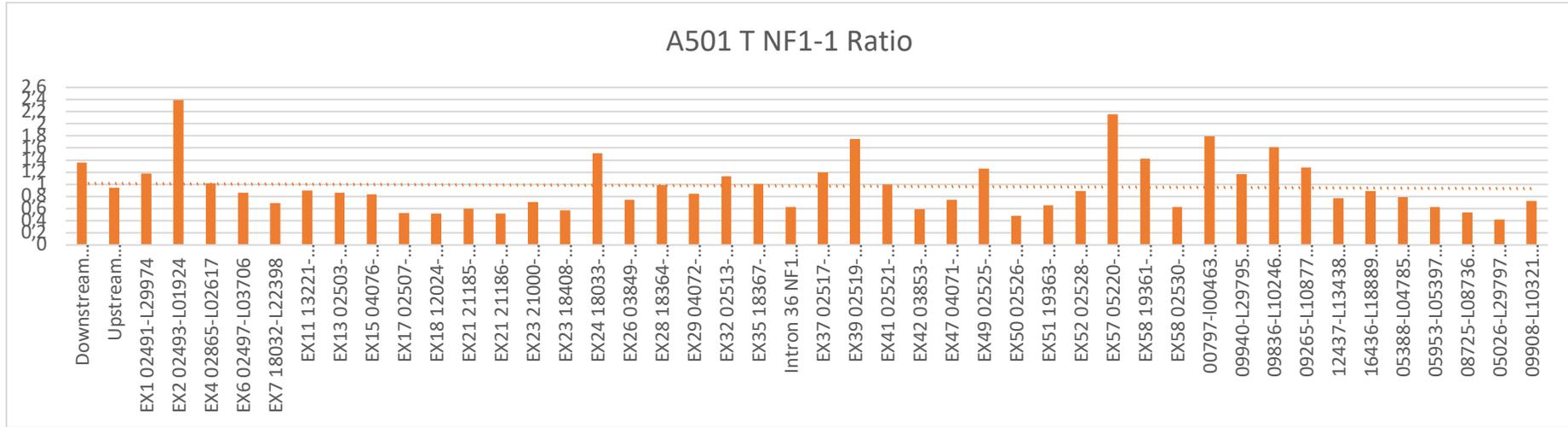
3. CASO 2-MET (MUESTRA A241-MET)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	1,278185372	NF1 EX 01	0,890891704
NF1 - U	0,690387514	NF1 EX 01	0,565886185
NF1 EX 01	1,027157738	NF1 EX 03	2,184383123
NF1 EX 02	2,572438621	NF1 EX 05	2,027158564
NF1 EX 04	0,962806487	NF1 EX 08	0,733229379
NF1 EX 06	0,795327182	NF1 EX 09	0,229530619
NF1 EX 07	0,694237602	NF1 EX 10	1,241476487
NF1 EX 11	1,136366721	NF1 EX 12	1,118183745
NF1 EX 13	1,004447367	NF1 EX 14	0,887442186
NF1 EX 15	0,919482972	NF1 EX 15	1,436781386
NF1 EX 17	0,592695852	NF1 EX 16	1,416856536
NF1 EX 18	0,394730553	NF1 EX 19	0,266085741
NF1 EX 21	0,707600933	NF1 EX 20	0,667595428
NF1 EX 21	0,444950426	NF1 EX 22	0,236037978
NF1 EX 23	0,845574634	NF1 EX 25	0,612572033
NF1 EX 23	0,569099814	NF1 EX 27	0,190063667
NF1 EX 24	2,342299155	NF1 EX 30	2,401637252
NF1 EX 26	0,736873422	NF1 EX 31	0,125033295
NF1 EX 28	1,317437326	NF1 EX 33	0,130971671
NF1 EX 29	0,571381157	NF1 EX 34	2,183101561
NF1 EX 32	1,864808863	NF1 EX 36	1,390887885
NF1 EX 35	1,474438148	OMG INT 36	0,186604848
OMG INT 36	0,505109824	NF1 EX 38	1,115547569
NF1 EX 37	0,827023669	NF1 EX 40	0,923840206
NF1 EX 39	1,481645898	NF1 EX 43	0,142191506
NF1 EX 41	0,760107166	NF1 EX 44	1,024365498
NF1 EX 42	0,391305982	NF1 EX 45	0,168590051
NF1 EX 47	0,673991661	NF1 EX 46	1,386730116
NF1 EX 49	0,9066611	NF1 EX 48	0,661735528
NF1 EX 50	0,346408402	NF1 EX 51	0,624002845
NF1 EX 51	0,536292102	NF1 EX 53	1,019619678
NF1 EX 52	0,44844716	NF1 EX 54	0,852962223
NF1 EX 57	2,257004562	NF1 EX 55	0,702110959
NF1 EX 58	1,503270072	NF1 EX 56	0,142674794
NF1 EX 58	0,271891004	NF1 IN 01	0,910033567



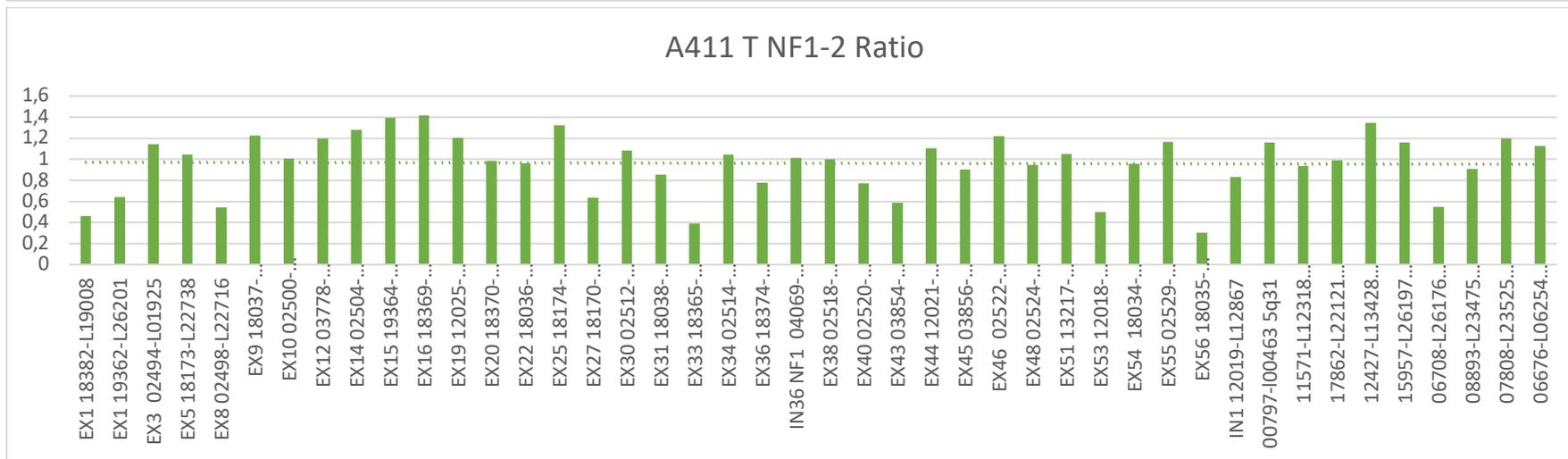
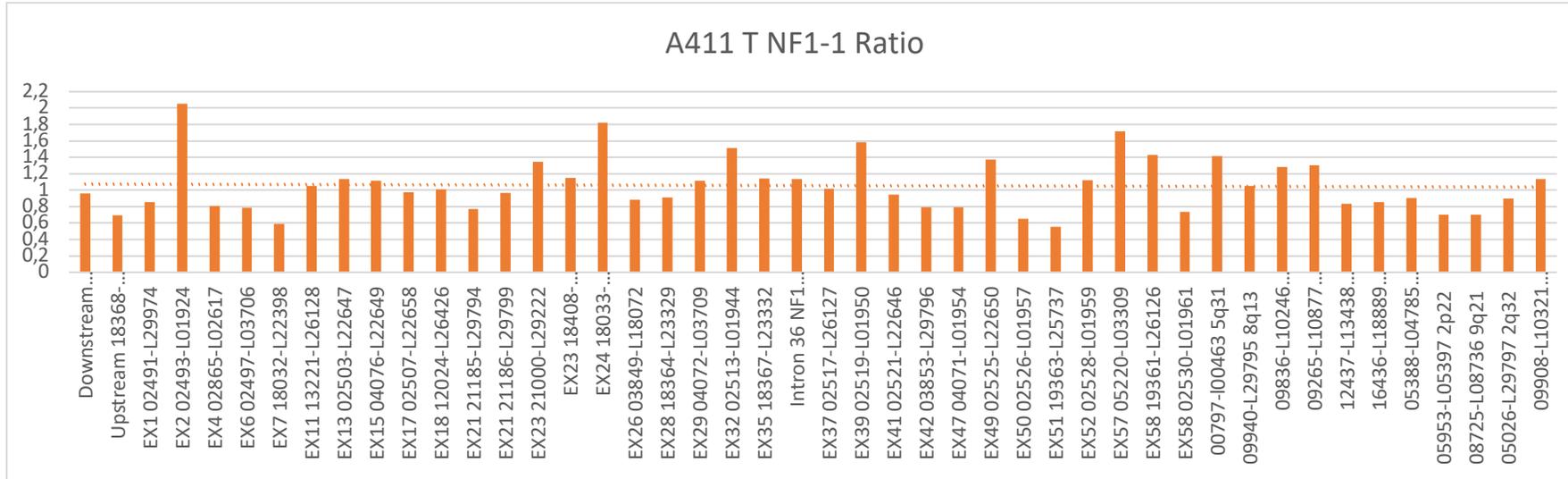
4. CASO 3 (MUESTRA A461 MET)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	0,715933331	NF1 EX 01	0,300600015
NF1 - U	0,564887396	NF1 EX 01	0,570147446
NF1 EX 01	0,58228031	NF1 EX 03	0,886534195
NF1 EX 02	1,51521446	NF1 EX 05	0,763813955
NF1 EX 04	0,589243037	NF1 EX 08	0,477021614
NF1 EX 06	0,621982519	NF1 EX 09	2,125776615
NF1 EX 07	0,423205537	NF1 EX 10	0,967275739
NF1 EX 11	0,869741775	NF1 EX 12	1,258264944
NF1 EX 13	1,234667657	NF1 EX 14	1,447692755
NF1 EX 15	1,048014723	NF1 EX 15	1,554732177
NF1 EX 17	1,304173772	NF1 EX 16	1,633272631
NF1 EX 18	1,865953777	NF1 EX 19	2,134501208
NF1 EX 21	0,811893736	NF1 EX 20	1,240447537
NF1 EX 21	1,697905796	NF1 EX 22	1,995285466
NF1 EX 23	1,657348699	NF1 EX 25	1,736231484
NF1 EX 23	2,186176179	NF1 EX 27	0,955460959
NF1 EX 24	1,633812447	NF1 EX 30	0,844458129
NF1 EX 26	0,81410221	NF1 EX 31	1,658802798
NF1 EX 28	0,670469794	NF1 EX 33	0,61761183
NF1 EX 29	1,738925532	NF1 EX 34	0,799914002
NF1 EX 32	1,220609469	NF1 EX 36	0,713339602
NF1 EX 35	0,868004639	OMG INT 36	1,791723635
OMG INT 36	1,962907826	NF1 EX 38	0,941181351
NF1 EX 37	0,902367571	NF1 EX 40	0,747764574
NF1 EX 39	1,358530623	NF1 EX 43	0,992285092
NF1 EX 41	0,991410769	NF1 EX 44	1,176008945
NF1 EX 42	1,252658889	NF1 EX 45	1,73170522
NF1 EX 47	0,849725177	NF1 EX 46	1,306504702
NF1 EX 49	1,547088477	NF1 EX 48	1,091542966
NF1 EX 50	0,844874733	NF1 EX 51	1,246007823
NF1 EX 51	0,474590662	NF1 EX 53	0,389957292
NF1 EX 52	1,689237423	NF1 EX 54	1,042522897
NF1 EX 57	1,309778016	NF1 EX 55	1,557429283
NF1 EX 58	1,143692732	NF1 EX 56	0,429556797
NF1 EX 58	1,329976656	NF1 IN 01	0,698494055



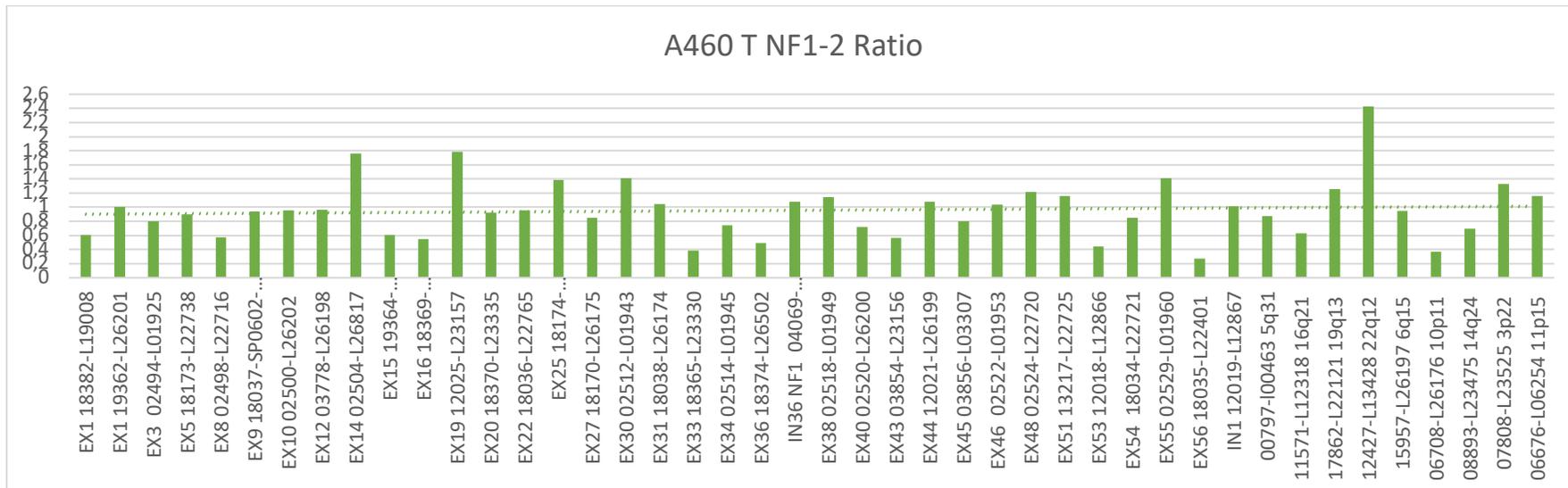
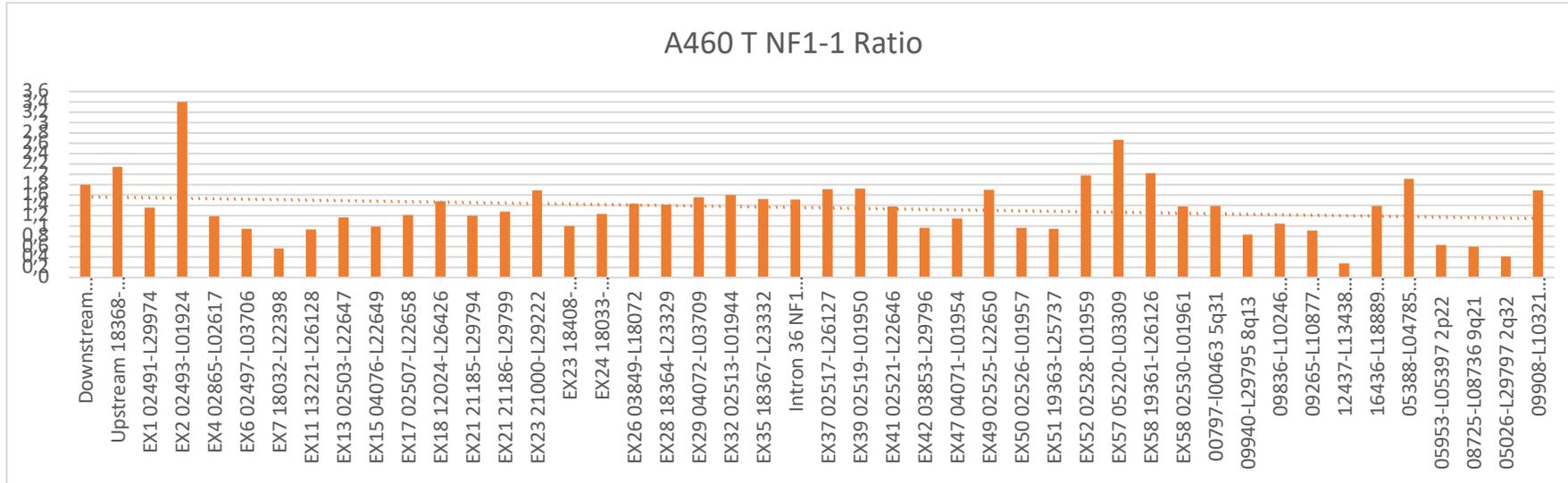
7. CASO 6 (MUESTRA A411 T)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	0,960383912	NF1 EX 01	0,459007838
NF1 - U	0,691563921	NF1 EX 01	0,642645613
NF1 EX 01	0,855194953	NF1 EX 03	1,146032221
NF1 EX 02	2,054622281	NF1 EX 05	1,044662722
NF1 EX 04	0,807201911	NF1 EX 08	0,543952189
NF1 EX 06	0,785853448	NF1 EX 09	1,22615398
NF1 EX 07	0,586702354	NF1 EX 10	1,007700723
NF1 EX 11	1,049384591	NF1 EX 12	1,197104427
NF1 EX 13	1,138771101	NF1 EX 14	1,280146126
NF1 EX 15	1,112975551	NF1 EX 15	1,393498584
NF1 EX 17	0,97614424	NF1 EX 16	1,416263308
NF1 EX 18	1,006844304	NF1 EX 19	1,201107891
NF1 EX 21	0,774434807	NF1 EX 20	0,986092555
NF1 EX 21	0,966197186	NF1 EX 22	0,962462695
NF1 EX 23	1,346639698	NF1 EX 25	1,323957101
NF1 EX 23	1,152677728	NF1 EX 27	0,633799688
NF1 EX 24	1,821586794	NF1 EX 30	1,081696172
NF1 EX 26	0,88574038	NF1 EX 31	0,852652768
NF1 EX 28	0,911108546	NF1 EX 33	0,389578462
NF1 EX 29	1,115024113	NF1 EX 34	1,04297583
NF1 EX 32	1,510114994	NF1 EX 36	0,776332123
NF1 EX 35	1,144268881	OMG INT 36	1,014169016
OMG INT 36	1,13436305	NF1 EX 38	1,000573247
NF1 EX 37	1,017771643	NF1 EX 40	0,772903264
NF1 EX 39	1,583017962	NF1 EX 43	0,585455986
NF1 EX 41	0,946210473	NF1 EX 44	1,105801929
NF1 EX 42	0,789291696	NF1 EX 45	0,9045983
NF1 EX 47	0,795187384	NF1 EX 46	1,220865026
NF1 EX 49	1,370618963	NF1 EX 48	0,949120706
NF1 EX 50	0,653944211	NF1 EX 51	1,052452969
NF1 EX 51	0,553275067	NF1 EX 53	0,500939578
NF1 EX 52	1,123706249	NF1 EX 54	0,959518714
NF1 EX 57	1,716884948	NF1 EX 55	1,164527235
NF1 EX 58	1,431618175	NF1 EX 56	0,303403911
NF1 EX 58	0,735826156	NF1 IN 01	0,832381673



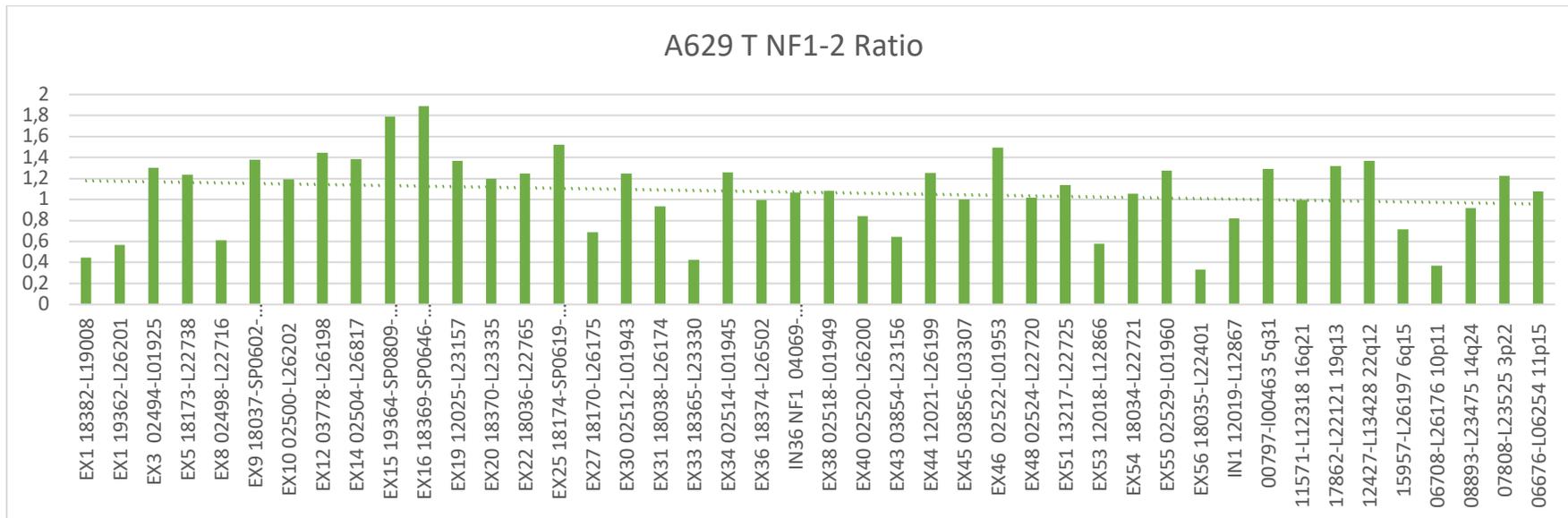
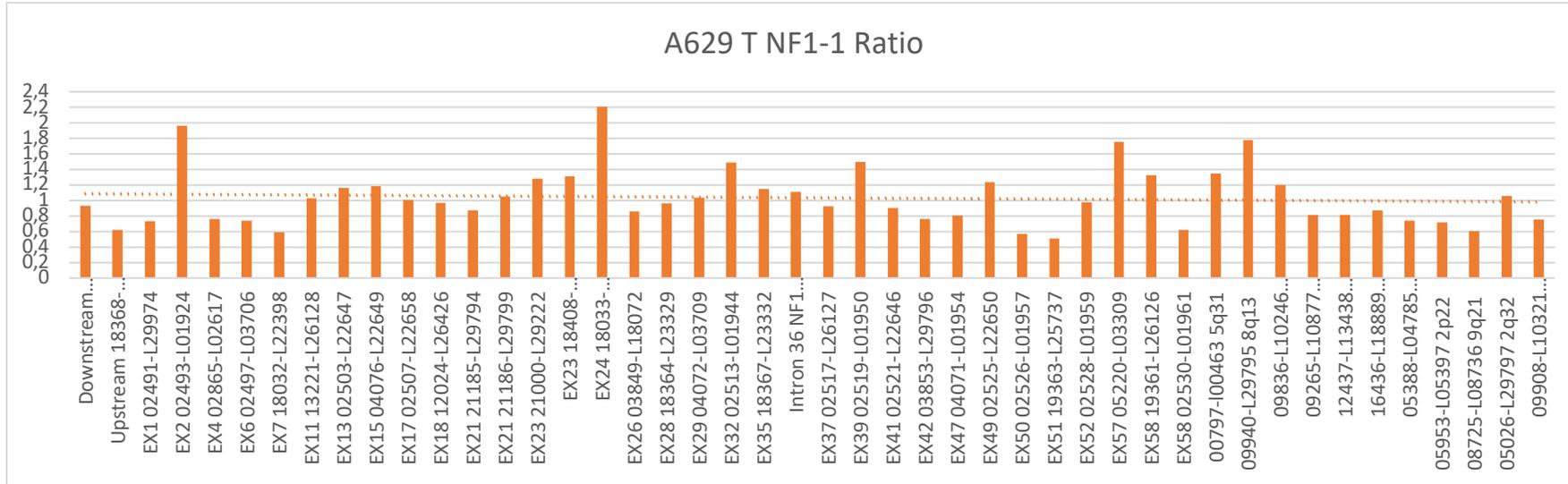
8. CASO 7 (MUESTRA A460 T)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	1,792618804	NF1 EX 01	0,6048661
NF1 - U	2,144614055	NF1 EX 01	1,006097654
NF1 EX 01	1,351693234	NF1 EX 03	0,800177409
NF1 EX 02	3,401968361	NF1 EX 05	0,899653053
NF1 EX 04	1,190595583	NF1 EX 08	0,568017928
NF1 EX 06	0,93551816	NF1 EX 09	0,936522695
NF1 EX 07	0,566026408	NF1 EX 10	0,951848403
NF1 EX 11	0,925816275	NF1 EX 12	0,963964135
NF1 EX 13	1,159938864	NF1 EX 14	1,761197113
NF1 EX 15	0,985625107	NF1 EX 15	0,607927504
NF1 EX 17	1,211329653	NF1 EX 16	0,545958328
NF1 EX 18	1,471890428	NF1 EX 19	1,783219314
NF1 EX 21	1,198210156	NF1 EX 20	0,920897353
NF1 EX 21	1,275792063	NF1 EX 22	0,953506247
NF1 EX 23	1,683172177	NF1 EX 25	1,390110112
NF1 EX 23	0,993311905	NF1 EX 27	0,848296555
NF1 EX 24	1,229339077	NF1 EX 30	1,408836603
NF1 EX 26	1,433581372	NF1 EX 31	1,04731656
NF1 EX 28	1,406488794	NF1 EX 33	0,38844835
NF1 EX 29	1,546953916	NF1 EX 34	0,73964591
NF1 EX 32	1,60221972	NF1 EX 36	0,488193563
NF1 EX 35	1,517646896	OMG INT 36	1,073329757
OMG INT 36	1,511423144	NF1 EX 38	1,145634674
NF1 EX 37	1,706120056	NF1 EX 40	0,719176394
NF1 EX 39	1,71867852	NF1 EX 43	0,561229268
NF1 EX 41	1,369961702	NF1 EX 44	1,076493738
NF1 EX 42	0,961796625	NF1 EX 45	0,803596673
NF1 EX 47	1,144019271	NF1 EX 46	1,036624193
NF1 EX 49	1,698706746	NF1 EX 48	1,217898385
NF1 EX 50	0,959663811	NF1 EX 51	1,160992985
NF1 EX 51	0,945157004	NF1 EX 53	0,439312086
NF1 EX 52	1,980102966	NF1 EX 54	0,845002587
NF1 EX 57	2,667639308	NF1 EX 55	1,41007526
NF1 EX 58	2,024490591	NF1 EX 56	0,267159775
NF1 EX 58	1,378422932	NF1 IN 01	1,011834064



9. CASO 8 (MUESTRA A629 T)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	0,930576092	NF1 EX 01	0,446197614
NF1 - U	0,620277137	NF1 EX 01	0,568086195
NF1 EX 01	0,7285129	NF1 EX 03	1,300642259
NF1 EX 02	1,95903491	NF1 EX 05	1,235365825
NF1 EX 04	0,76312424	NF1 EX 08	0,609224863
NF1 EX 06	0,740304647	NF1 EX 09	1,376974262
NF1 EX 07	0,588385433	NF1 EX 10	1,194137976
NF1 EX 11	1,02396591	NF1 EX 12	1,442743643
NF1 EX 13	1,157959733	NF1 EX 14	1,382706233
NF1 EX 15	1,18352062	NF1 EX 15	1,792222752
NF1 EX 17	1,005321919	NF1 EX 16	1,890887279
NF1 EX 18	0,968241428	NF1 EX 19	1,368408444
NF1 EX 21	0,86865139	NF1 EX 20	1,197151651
NF1 EX 21	1,047105651	NF1 EX 22	1,24824502
NF1 EX 23	1,281070967	NF1 EX 25	1,519469148
NF1 EX 23	1,308848499	NF1 EX 27	0,685611543
NF1 EX 24	2,205742758	NF1 EX 30	1,248635072
NF1 EX 26	0,853777378	NF1 EX 31	0,932522284
NF1 EX 28	0,959314694	NF1 EX 33	0,422574005
NF1 EX 29	1,032583694	NF1 EX 34	1,261019093
NF1 EX 32	1,490281334	NF1 EX 36	0,995800164
NF1 EX 35	1,145148342	OMG INT 36	1,0647863
OMG INT 36	1,108187641	NF1 EX 38	1,084850466
NF1 EX 37	0,923629058	NF1 EX 40	0,84176441
NF1 EX 39	1,492814265	NF1 EX 43	0,642919803
NF1 EX 41	0,902191831	NF1 EX 44	1,251772015
NF1 EX 42	0,763733636	NF1 EX 45	1,002674905
NF1 EX 47	0,807063695	NF1 EX 46	1,496127064
NF1 EX 49	1,231780767	NF1 EX 48	1,019887939
NF1 EX 50	0,567819454	NF1 EX 51	1,137723612
NF1 EX 51	0,510503372	NF1 EX 53	0,577527364
NF1 EX 52	0,975777866	NF1 EX 54	1,056896394
NF1 EX 57	1,756013747	NF1 EX 55	1,272715679
NF1 EX 58	1,325988857	NF1 EX 56	0,328467403
NF1 EX 58	0,618853719	NF1 IN 01	0,81859



10. CASO 9 CASO 9 (MUESTRA A362 T)

MLPA 1 (NF1-1)		MLPA 2 (NF1-2)	
Gen	Ratio	Gen	Ratio
NF1 - D	0,762187262	NF1 EX 01	0,517062028
NF1 - U	0,503201832	NF1 EX 01	0,742871738
NF1 EX 01	0,716101936	NF1 EX 03	1,582596401
NF1 EX 02	2,128270257	NF1 EX 05	1,391308078
NF1 EX 04	0,798494205	NF1 EX 08	0,74698309
NF1 EX 06	0,791080911	NF1 EX 09	1,434813152
NF1 EX 07	0,61595494	NF1 EX 10	1,357286107
NF1 EX 11	1,152815078	NF1 EX 12	1,798067721
NF1 EX 13	1,350320413	NF1 EX 14	1,755747435
NF1 EX 15	1,309798529	NF1 EX 15	2,043130975
NF1 EX 17	1,177738787	NF1 EX 16	2,116623486
NF1 EX 18	1,225662674	NF1 EX 19	1,698569686
NF1 EX 21	0,897835575	NF1 EX 20	1,415999
NF1 EX 21	1,256485048	NF1 EX 22	1,456219108
NF1 EX 23	1,529677614	NF1 EX 25	1,638440054
NF1 EX 23	1,522030639	NF1 EX 27	0,83278792
NF1 EX 24	2,236927161	NF1 EX 30	1,525953718
NF1 EX 26	0,92994209	NF1 EX 31	1,011186713
NF1 EX 28	0,985311088	NF1 EX 33	0,535094689
NF1 EX 29	1,202107846	NF1 EX 34	1,48631756
NF1 EX 32	1,621556588	NF1 EX 36	1,179182316
NF1 EX 35	1,207042981	OMG INT 36	1,034698322
OMG INT 36	1,302636157	NF1 EX 38	1,351117744
NF1 EX 37	0,989760147	NF1 EX 40	0,781632774
NF1 EX 39	1,688099061	NF1 EX 43	0,543899391
NF1 EX 41	0,762706452	NF1 EX 44	1,236435963
NF1 EX 42	0,707504732	NF1 EX 45	0,813157504
NF1 EX 47	0,658533589	NF1 EX 46	1,281024123
NF1 EX 49	1,120485938	NF1 EX 48	0,934748781
NF1 EX 50	0,504232536	NF1 EX 51	1,017914896
NF1 EX 51	0,427887195	NF1 EX 53	0,553377464
NF1 EX 52	0,933250345	NF1 EX 54	1,018472051
NF1 EX 57	1,354271028	NF1 EX 55	1,148085354
NF1 EX 58	1,091885376	NF1 EX 56	0,296329755
NF1 EX 58	0,632932594	NF1 IN 01	0,868834239

9.4 MATERIAL SUPLEMENTARIO 4: ANÁLISIS WES.

