

Aplicación de la técnica de Hibridación Genómica Comparada en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con melanoma.

Patricia Hernández López^{1, 2, a}, José Luis Rodríguez Peralto², Yolanda Ruano Domínguez²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Instituto i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041, Madrid, España.

a. patri.hl.94@gmail.com

Palabras clave: ADN circulante; Hibridación Genómica Comparada; melanoma; plasma

Resumen

Los melanocitos pueden originar distintos tipos de neoplasias, que se clasifican según su comportamiento biológico en benignas (nevi y nódulos proliferativos) y malignas (melanomas). Habitualmente el diagnóstico diferencial entre ellas se realiza mediante análisis histopatológicos rutinarios. Sin embargo, en ocasiones estos no son suficientes, por lo que, debido a la diferente importancia clínica existente entre estas neoplasias, se hace necesario utilizar técnicas más precisas. Entre éstas destaca la Hibridación Genómica Comparada (CGH), cuyo uso está empezando a aplicarse en el diagnóstico de estos tumores, pues se ha observado que la ganancia y/o pérdida de material genético es común en los melanomas, al contrario que los nevi, que no presentan aberraciones cromosómicas. El kit OncoScan FFPE Assay utilizado en este estudio está diseñado específicamente para trabajar con muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE), facilitando el empleo de esta técnica para el diagnóstico de este tipo de muestras en la rutina hospitalaria. Por otra parte, este kit permite analizar el ADN circulante obtenido a partir de plasma, lo cual podría tener gran relevancia en el seguimiento y monitorización de pacientes con melanoma. En este trabajo se analizaron muestras de tejido FFPE de 23 melanomas, 11 nevi y 1 nódulo proliferativo mediante CGH, con el fin de determinar las aberraciones genómicas más frecuentes en cada tipo de lesión. Asimismo, se analizó por CGH el ADN circulante del plasma de dos pacientes con melanoma metastásico. Los resultados hallados demostraron la capacidad de esta técnica para detectar aberraciones cromosómicas en plasma, que además fueron comparadas con las alteraciones encontradas en el tejido tumoral de los mismos pacientes, revelando cierta semejanza entre ellas. Los hallazgos obtenidos en este trabajo apoyan el uso de la CGH tanto para el diagnóstico de melanoma como para evaluar el seguimiento de los pacientes que lo padecen.

Cita: Hernández López, Patricia; Rodríguez Peralto, José Luis; Ruano Domínguez, Yolanda (2017) Aplicación de la técnica de Hibridación Genómica Comparada en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con melanoma. *dianas* 6 (2): e20170904. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20170904.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Hernández-López P, Rodríguez-Peralto JL, Ruano-Domínguez Y. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Los melanocitos son células productoras de melanina, localizadas principalmente en la piel, capaces de originar distintos tipos de neoplasias. Éstas pueden ser clasificadas en función de su comportamiento biológico en benignas o malignas. Las primeras reciben el nombre de nevus (nevi en plural), mientras que las segundas se denominan melanomas [1]. Además, cabe destacar la existencia de un tercer tipo de lesión, perteneciente al grupo de neoplasias benignas y denominada nódulo proliferativo, que se caracteriza por desarrollarse, de manera focal, en determinados nevi congénitos [2].

Actualmente, los melanomas constituyen un problema de salud pública importante. Aunque su incidencia es relativamente baja respecto a otros tipos de cáncer, ésta ha aumentado en los últimos 30 años, convirtiéndose en un tumor emergente [3]. Asimismo, los melanomas presentan una alta mortalidad, de hecho, son los responsables del 75% de muertes causadas por cáncer de piel [4]. Una de las principales causas de su gran letalidad, es su elevada capacidad metastásica, siendo considerado el tumor con mayor propensión a metastatizar. Por todo ello, es importante llevar a cabo un diagnóstico precoz en este tipo de tumor, pues su identificación en las primeras etapas permite su extirpación quirúrgica y un mayor éxito terapéutico. Esto convierte al diagnóstico en una de las herramientas más importantes para mejorar la supervivencia de los pacientes que sufren esta enfermedad [5]. Resulta por tanto imprescindible mejorar las técnicas diagnósticas, con el fin de obtener evaluaciones más precisas que permitan efectuar mejores abordajes clínicos basados en la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Habitualmente el diagnóstico de melanoma se lleva a cabo mediante la realización de análisis histopatológicos rutinarios, basados en el análisis de la morfología en preparaciones de hematoxilina-eosina. Sin embargo, aunque el patólogo atesore mucha experiencia diagnosticando este tipo de tumores,

en ocasiones estos no son herramientas suficientes para diferenciar los nevi (benignos) de los melanomas (malignos), lo cual tiene una gran trascendencia clínica. Esta dificultad diagnóstica, hace necesario recurrir a técnicas más precisas. Entre los métodos que están empezando a utilizarse en el diagnóstico diferencial de nevus y melanoma, destacan técnicas citogenéticas como la Hibridación in situ Fluorescente (FISH) o la Hibridación Genómica Comparada (CGH), ambas basadas en el análisis del número de copias cromosómicas. Esto se debe a que se ha observado que la ganancia y/o pérdida de material genético es común en los melanomas, al contrario que los nevi, que no presentan aberraciones cromosómicas [6-8]. Del mismo modo, se ha comprobado que los nódulos proliferativos también presentan variaciones en el número de copias cromosómicas, pero a diferencia de los melanomas, en los que las aberraciones que tienen lugar son estructurales (ganancia o pérdida de fragmentos cromosómicos), en los nódulos proliferativos, se produce la ganancia y/o pérdida de cromosomas completos, lo cual explicaría su benignidad, debido al equilibrio que se produciría entre la ganancia de genes que proporcionan ventajas para el crecimiento y la proliferación, y genes que inhiben ambos procesos (Tabla 1) [9].

Tipo de neoplasia	Tipo de alteración genómica	Principales variaciones en el número de copias
Nevus	Sin alteraciones o en baja cantidad	↑ 11p y ↓ 3p21
Nódulo proliferativo	Ganancia y/o pérdida de cromosomas completos	Sin patrón determinado
Melanoma	Aberraciones estructurales (ganancia y/o pérdida de fragmentos cromosómicos)	↑ 1q, 6p, 7, 8q, 17q y 20q ↓ 6q, 8p, 9p y 10q

Tabla 1.- Resumen de alteraciones genómicas en nevus, nódulo proliferativo y melanoma. En la tabla se recogen las principales alteraciones en el número de copias genómicas de nevus, nódulo proliferativo y melanoma descritas en la bibliografía [1, 7-9]. El símbolo ↑ representa las ganancias, y ↓ las pérdidas.

Por tanto, el uso de estas técnicas citogenéticas constituye una herramienta fundamental en el diagnóstico de este tipo de tumores. No obstante, cabe destacar una mayor capacidad informativa de la CGH, pues al contrario que la FISH, que únicamente permite evaluar alteraciones de loci específicos, la CGH permite analizar todo el genoma de manera simultánea. De hecho, la aplicación de FISH para el diagnóstico de melanoma está basada en conocimientos derivados de la CGH [10]. Igualmente, el estudio por FISH, presenta otras limitaciones, como un difícil análisis de los resultados y una sesgada interpretación del investigador, por lo que únicamente debe utilizarse como técnica auxiliar [11].

Por otra parte, en ocasiones, la utilización de biopsias de tejido para el diagnóstico presenta ciertas limitaciones, como una elevada invasividad para el paciente o la dificultad para obtener suficiente cantidad de muestra. Además, se ha visto que el perfil molecular de los tumores es dinámico y cambia con el tiempo, por lo que sería útil la realización de muestreos de manera repetida, lo cual no es posible al utilizar biopsias de tejido. Este problema podría ser solventado con la biopsia líquida, cuya importancia ha aumentado en los últimos años [12]. Esto podría ser llevado a cabo mediante el análisis de ADN circulante de tumor (también llamado ADN libre de células), ya que se ha observado que las células tumorales liberan ADN a la sangre, y que, además, este mantiene las alteraciones genéticas del tumor original (mutaciones, variación en el número de copias...) [13]. Aunque el origen de este ADN no está del todo claro, se piensa que procede de células apoptóticas o necróticas del tumor, células vivas del tumor y células del tumor circulantes. Asimismo, se ha visto que la cantidad de ADN libre aumenta con el estadio del tumor (a etapas más avanzadas, más cantidad de ADN), así como con el tamaño y la agresividad del mismo. En este sentido, se ha comprobado que el ADN circulante de tumor presenta un papel fundamental en el desarrollo de metástasis, promoviendo la transformación oncogénica de células somáticas en células tumorales, originando de este modo metástasis a distancia (genometástasis) [13] [14]. En cuanto a su uso en clínica, los investigadores han constatado que su análisis, aparte de poco invasivo, es altamente sensible y específico en la evaluación de las lesiones genéticas, lo cual lo convierte en una potencial herramienta de diagnóstico, tanto en etapas avanzadas como tempranas de la enfermedad. Del mismo modo, su estudio permitiría también analizar la evolución de la enfermedad, evaluando parámetros como progresión, pronóstico o respuesta a tratamientos, e incluso permitiría avanzar en el desarrollo de terapias dirigidas. Además, cabe destacar las ventajas que conllevaría la utilización de la biopsia líquida en clínica, pues gracias a su baja invasividad y riesgo, podría realizarse de manera rutinaria en el seguimiento de los pacientes [13, 15].

En cuanto al análisis de ADN circulante de tumor en melanomas, las líneas de investigación actuales se basan en la identificación de mutaciones puntuales como *BRAF* V600E. Ésta constituye la mutación

somática puntual más frecuente en melanomas, afectando al 50% de ellos [11], y su identificación permite tratar a los pacientes que la portan con terapias dirigidas mediante el uso de inhibidores de *BRAF* V600E tales como vemurafenib o dabrafenib, que presentan altas tasas de respuesta y una mejora notable en la supervivencia. Por ello, análisis periódicos del ADN libre de los pacientes, podrían servir para evaluar la evolución de los mismos [14, 16]. No obstante, *BRAF* no está mutado en todos los melanomas, lo cual abre una nueva línea de investigación orientada a la búsqueda de nuevos marcadores de melanoma basados en el análisis del ADN circulante de tumor [15].

Con todo ello, se plantean dos objetivos principales para el presente trabajo. En primer lugar, se realizará un análisis exhaustivo, mediante CGH, de las principales alteraciones en la variación del número de copias observadas en neoplasias melanocíticas benignas (nevus y nódulo proliferativo) y malignas (melanoma), con el fin de caracterizar las aberraciones genómicas más comunes y ampliar los conocimientos sobre las mismas, así como con el propósito de que la CGH pueda ser aplicada al diagnóstico diferencial de ambos tipos de lesiones en la rutina diaria. El segundo objetivo del estudio es realizar una primera aproximación para la utilización de la técnica de CGH en el análisis de ADN circulante extraído a partir del plasma de pacientes con melanoma metastásico, con la finalidad de detectar el tumor sin necesidad de volver a biopsiar al paciente, lo cual sería de gran utilidad en la monitorización de pacientes con melanoma. Asimismo, se tratará de comprobar si las alteraciones en el número de copias genómicas encontradas en plasma se corresponden con las detectadas en el tejido del paciente.

Métodos

Selección de casos

Para el estudio de las alteraciones en el número de copias cromosómicas más comunes en melanoma, se seleccionaron muestras de tejido FFPE de 35 pacientes (23 melanomas, 11 nevi y 1 nódulo proliferativo), procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre. Todos los casos se escogieron atendiendo a la disponibilidad de tejido tumoral para realizar CGH mediante el análisis con hematoxilina y eosina, para seleccionar por macrodissección las regiones más representativas de tumor.

En cuanto al estudio de ADN circulante tumoral, se incluyeron plasmas de 2 pacientes con melanoma metastásico procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre, que en el momento de la extracción no habían recibido tratamiento. Asimismo, se analizaron por CGH las biopsias de tejido correspondientes a cada paciente.

Extracción de ADN a partir de tejido embebido en parafina (FFPE)

La extracción de ADN de los tejidos FFPE se realizó utilizando el kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La cuantificación del mismo se realizó utilizando el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con el kit Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen). La calidad de las muestras se analizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 de (Thermo Fisher Scientific, Delaware, EE.UU).

Obtención de plasma a partir de sangre total

Se realizaron extracciones de entre 10 y 20 ml de sangre total a los pacientes en tubos EDTA, y se mantuvieron a 4°C como máximo 3 horas hasta la obtención del plasma. La extracción del plasma se realizó centrifugando la sangre total a 1900 x g durante 10 minutos, tras lo cual los sobrenadantes se transfirieron cuidadosamente, sin perturbar la capa leucocitaria, a nuevos tubos. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a 16000 x g durante 10 minutos, tras lo cual se descartó el pellet y se conservó el sobrenadante (plasma), que se congeló a -80°C hasta su utilización en la extracción de ADN circulante.

Extracción y cuantificación de ADN circulante

La extracción de ADN circulante a partir de plasma sanguíneo se realizó utilizando el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El proceso seguido para la cuantificación y el análisis de la calidad de éste fue el mismo que el descrito en la extracción de ADN a partir de tejido FFPE.

Análisis de aberraciones cromosómicas por CGH

El análisis del número de copias genómico de cada muestra se realizó mediante CGH utilizando el kit OncoScan FFPE Assay Kit de (Affymetrix, California, EE.UU) basado en el uso de sondas de inversión molecular (MIP), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Además, éste se utilizó para estudiar mutaciones somáticas de 46 genes entre los que se encontraba *BRAF*. Para lavar y teñir los *arrays* se utilizó la plataforma GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) y para escanearlos se empleó

el escáner GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Los datos proporcionados por este último (archivos “.CEL”) fueron convertidos a archivos “.OSCHP” a través de OncoScan Console Software (Affymetrix), tras lo cual fueron procesados y analizados con Nexus Express for OncoScan Software (Biodiscovery, California, EE.UU) y Chromosome Analysis Suite (ChAS) (Affymetrix).

Análisis de *BRAF*

El análisis de las mutaciones V600 de *BRAF* en plasma se realizó utilizando la plataforma de PCR a tiempo real de Idylla (Biocartis, Mechelen, Bélgica). Para su detección en tejido se aprovechó la capacidad del OncoScan Assay Kit (Affymetrix) para detectar mutaciones somáticas.

Hibridación in situ Fluorescente (FISH)

El análisis de FISH sobre tejido FFPE fue realizado según el protocolo de Vergier et al., 2010 [17]. Para ello, se utilizó la sonda de melanoma multicolor (Abbott Molecular, Rungis, Francia) que incluye el análisis del gen *RREB1* (6p25), *MYB* (6q23.2-q23.3) y *CCND1* (11q13.3). Se analizaron al menos 100 células para cada una de las sondas y se siguieron los criterios de Gerami et al., 2009 [18] y de la casa comercial Abbott Molecular para establecer los umbrales de positividad de las alteraciones encontradas.

Resultados

Alteraciones en el número de copias genómicas en muestras de tejido de lesiones melanocíticas

Con el fin de comprobar las principales alteraciones cromosómicas presentes en las diferentes neoplasias melanocíticas, se realizó el análisis, mediante CGH, de 11 nevi, 23 melanomas y 1 nódulo proliferativo. Los resultados obtenidos reflejaron un mayor número de alteraciones en el número de copias en melanomas que en nevi (Figura 1). Asimismo, se compararon por separado los resultados obtenidos por CGH en melanomas y nevi, con el fin de dilucidar las alteraciones que se repetían con mayor frecuencia en los distintos cromosomas para cada tipo de neoplasia. En cuanto a los nevi analizados, ninguno de ellos presentaba más de dos aberraciones cromosómicas, y únicamente el 45% presentaba entre una y dos. No obstante, aunque las variaciones en el número de copias genómicas de los nevi fueron notablemente menores, cabe destacar la detección de algunas alteraciones comunes, como ganancia del cromosoma 8 en un 10% de los casos estudiados (alcanzando el 36% en la región 8q), la del 11p observada en un 10% de las muestras analizadas y la pérdida de 3p21 en un 27% de los nevi estudiados (Figura 1A).

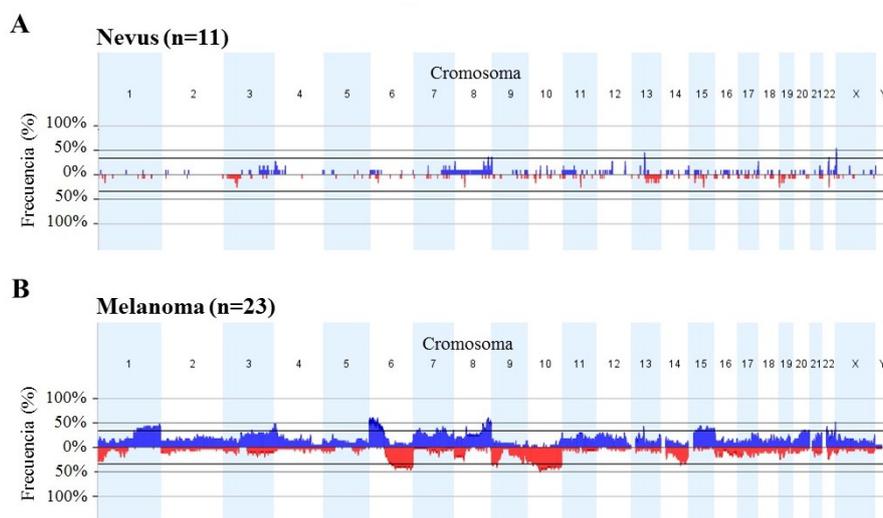


Figura 1.- Hibridación Genómica Comparada en muestras de tejido de nevus y melanoma. En la imagen se representa el porcentaje de nevi (n=11) (A) y melanomas estudiados (n=23) (B), en los que se observó ganancia (azul) o pérdida (rojo) del número de copias de las distintas regiones cromosómicas.

Respecto a los melanomas, las alteraciones más frecuentemente identificadas en la serie estudiada fueron la ganancia de los cromosomas 1q (48%), 3 (30%), 6p (62%), 7 (44%), 8q (61%), 15 (44%) y 20 (35%), y la pérdida de 1p36 (30%), 6q (48%), 9p (44%), 10 (52%), y 14 (35%) (Figura 1B).

Igualmente, se analizó por CGH un nódulo proliferativo, con el objetivo de identificar las variaciones en el número de copias cromosómicas que presentaba. Los resultados obtenidos mostraron la ganancia de los cromosomas 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20 y 22 completos (Figura 2).

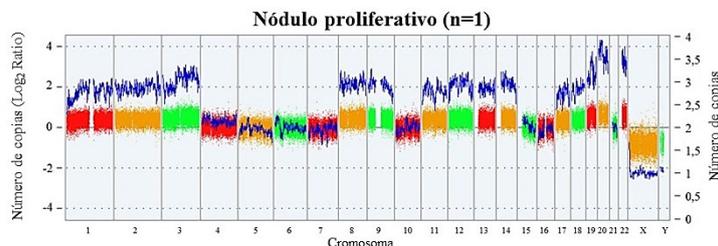


Figura 2.- Alteraciones en el número de copias de un nódulo proliferativo (n=1). En la imagen se representa el número de copias de cada cromosoma, considerándose como diploide, el valor 0 en Log2 y el valor 2 en el eje del número de copias en valor absoluto.

Análisis del número de copias genómicas en el plasma de pacientes con melanoma metastásico

Con el objetivo de comprobar la utilidad de la CGH en el análisis de ADN circulante y de su aplicabilidad en el seguimiento clínico de pacientes con melanoma, se analizaron, mediante CGH, las alteraciones cromosómicas presentes en el ADN circulante del plasma de 2 pacientes con melanoma metastásico. Además, una vez identificadas las alteraciones en plasma, éstas se compararon con las alteraciones presentes en los tejidos tumorales de dichos pacientes, con el propósito de comprobar si las aberraciones halladas en plasma se encontraban también en tejido.

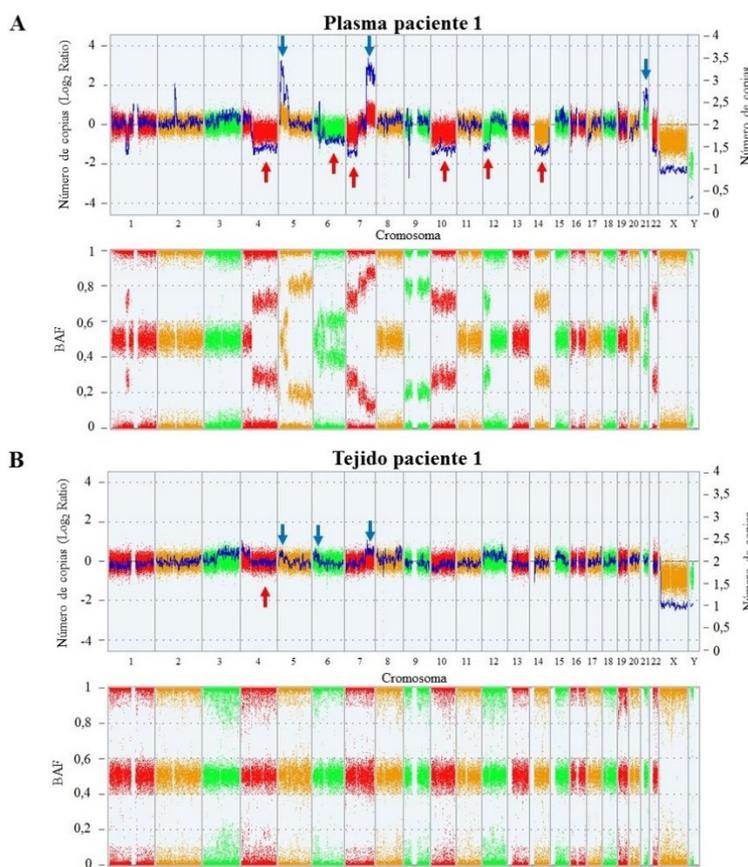


Figura 3.- Alteraciones en el número de copias en plasma (A) y tejido (B) del paciente 1. En el panel superior de ambas figuras (A y B) se representa el número de copias de cada cromosoma, considerándose como diploide, el valor 0 en Log2 y el valor absoluto 2 en el eje del número de copias. En el panel inferior se muestra la frecuencia del alelo B (BAF) que representa el grado de heterocigosis y homocigosis de la muestra. Las flechas azules marcan las ganancias y las rojas las pérdidas.

El primero de los pacientes (paciente 1), presentaba un melanoma que había metastatizado a varios órganos (piel, hígado, ganglios y huesos). El plasma utilizado para la CGH se extrajo en el mismo momento en el que se efectuó la biopsia de tejido, que fue realizada a partir de la metástasis en piel. El plasma fue analizado mediante PCR a tiempo real para examinar la mutación V600 del gen *BRAF*, pues su detección en éste es indicadora de la presencia de ADN circulante tumoral. El resultado fue positivo para la mutación *BRAF* V600E en el 84% del ADN circulante analizado. En cuanto a los resultados obtenidos por CGH en el análisis del ADN circulante de plasma se detectaron múltiples alteraciones

cromosómicas, tales como la ganancia del 5p, 7q y 21, y la pérdida de 4q, 6q, 7p, 10, 12p y 14 (Figura 3A). Por el contrario, no se detectaron alteraciones claras en el tejido, aunque se observó cierta tendencia en determinadas cromosomas, como la ganancia del 5p, 6p, y 7q o la pérdida del 4q (Figura 3B).

Posteriormente, con el fin de comprobar las alteraciones encontradas en tejido en tan baja frecuencia y dado que éste parecía presentar ganancia de 6p, se utilizó la sonda de FISH de melanoma (Abbott Molecular) para comprobar las ganancias en esta región (Figura 4). Aunque se observó aproximadamente un 17% de células con ganancia de *RREB1* (6p22), el porcentaje de éstas no fue significativo según los criterios de Gerami et al., 2009 [18] y/o Abbott Molecular (> 29-55% y $\geq 63\%$, respectivamente).

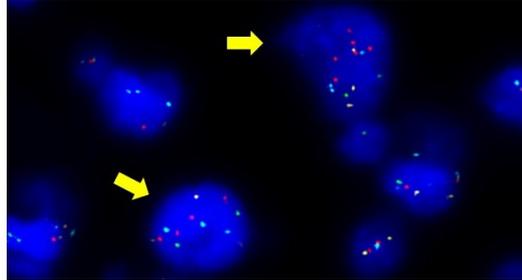


Figura 4.- Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en tejido tumoral del paciente 1. Se analizaron las regiones 6p25 (rojo), 6q (amarillo), centrómero del cromosoma 6 (azul claro) y 11q (verde). El núcleo fue teñido con DAPI (azul oscuro). Las flechas amarillas señalan células tumorales con ganancia de 6p.

En cuanto al segundo paciente (paciente 2), el tejido analizado por CGH se correspondía con el tumor primario (melanoma), mientras que el plasma fue extraído cuando el paciente presentaba metástasis en varios órganos (piel, ganglios, riñones, pulmones y hueso) y antes de recibir tratamiento. Igualmente, se analizó el gen *BRAF* por PCR a tiempo real y se observó que presentaba la mutación V600E (aproximadamente en 1% del ADN tumoral circulante) tanto en plasma como en tejido.

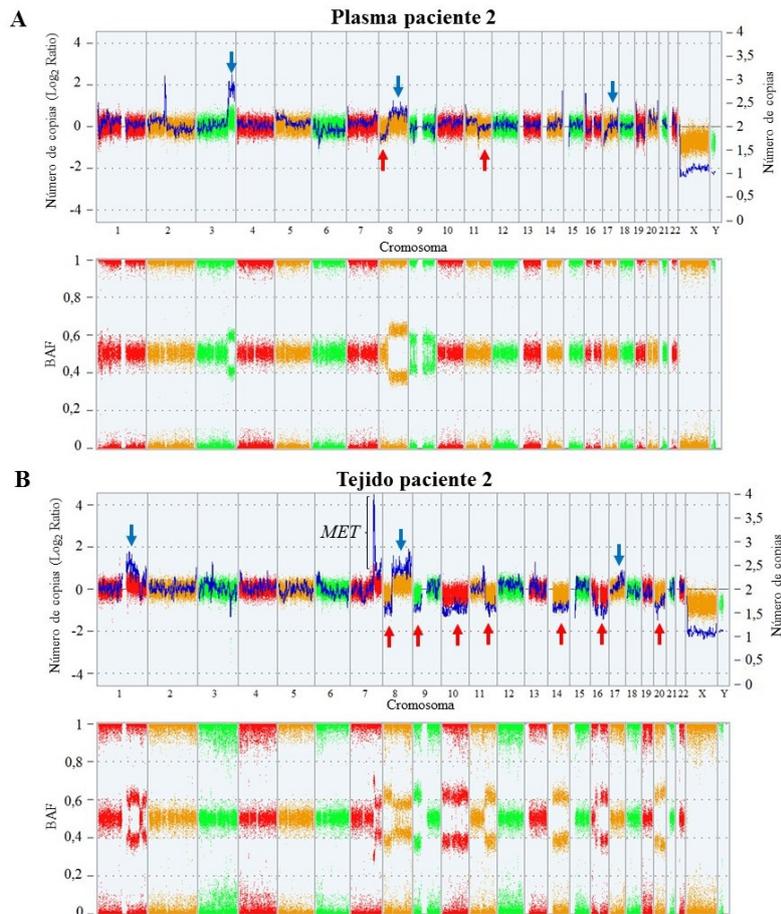


Figura 5.- Alteraciones en el número de copias en plasma (A) y tejido (B) del paciente 2. En el panel superior de ambas figuras (A y B) se representa el número de copias de cada cromosoma, considerándose como diploide, el valor 0 en Log2 y el valor absoluto 2 en el eje del número de copias. En el panel inferior se muestra la frecuencia del alelo B (BAF) que representa el grado de heterocigosis y homocigosis de la muestra. Las flechas azules marcan las ganancias y las rojas las pérdidas.

Los resultados obtenidos por CGH mostraron varias alteraciones claras en plasma, tales como la ganancia de 3q y 8q, y la pérdida de 8p (Figura 5A). En cuanto al tejido, se detectó un gran número de alteraciones, entre las que destacaron la ganancia del 1q, 8q y la pérdida de 8p, 9p, 10, 11q, 14, 16 y 20 (Figura 5B). Asimismo, se observó la amplificación del protooncogén *MET* (7q) en el tejido (Figura 5B), y otras alteraciones en más baja frecuencia como la ganancia del 17q en plasma y tejido, y la pérdida de 11q en plasma.

Discusión

La ambigüedad diagnóstica existente en el estudio histopatológico de determinados nevi y melanomas, plantea la necesidad de utilizar técnicas más precisas que permitan realizar un correcto diagnóstico diferencial entre ambos tipos de lesiones. Entre los métodos que están comenzando a utilizarse para solventar este problema, destacan las técnicas de FISH y CGH, ambas basadas en el análisis del número de copias cromosómicas, pues se ha observado que la ganancia y/o pérdida de material genético es común en los melanomas, al contrario que los nevi, que no presentan aberraciones cromosómicas [6]. En concreto, la CGH se postula como una prometedora herramienta diagnóstica para la diferenciación entre melanomas y nevi, debido a que la FISH presenta un mayor número de limitaciones, pues únicamente es capaz de detectar tres alteraciones (6p, 6q y 11q), que, aunque son las más frecuentes, no están presentes en todos los melanomas, permitiendo identificar solamente el 80% de ellos mediante esta técnica [10, 11].

Por todo ello, en este trabajo, se procedió a realizar una revisión experimental, mediante CGH, de las principales alteraciones genómicas de melanomas y nevi descritas en la bibliografía. En concreto, se analizaron las variaciones en el número de copias cromosómicas de 23 melanomas y 11 nevi. Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron un mayor número de alteraciones en el número de copias en melanomas que en nevi, tal y como han descrito previamente otros autores [1, 7-8]. En particular, nuestros resultados mostraron que ninguno de los nevi estudiados presentaba más de dos alteraciones cromosómicas, y únicamente el 45% presentaba entre una y dos variaciones en el número de copias, destacando la ganancia del cromosoma 8q, 11p y la pérdida del 3p21 como las alteraciones más frecuentes detectadas en nevi. En las regiones 11p y 3p21 se encuentran respectivamente el protooncogén *HRAS* y el gen supresor de tumores *BAP-1*, y ambas son alteraciones típicas de nevus, por lo que los resultados obtenidos en este estudio confirmarían lo descrito en la literatura [1]. En cuanto a la ganancia del cromosoma 8, no se ha descrito previamente como una alteración típica de este tipo de lesión, por lo que sería necesaria la realización de más estudios que permitiesen reafirmar o descartar los resultados obtenidos.

Respecto a los melanomas analizados en nuestra serie, todos mostraron algún tipo de alteración cromosómica. De ellos, el 70% presentó un perfil con alteraciones típicas descritas para melanoma, mientras que en el 30% restante el número de alteraciones típicas observado fue menor (menos de 3 alteraciones propias de melanoma), y estas se encontraban combinadas con otras no descritas en la bibliografía. De las alteraciones cromosómicas más frecuentemente encontradas en la serie de melanomas estudiados, 8 coincidían con las descritas en la bibliografía (ganancia del cromosoma 1q, 6p, 7, 8q y 20, y pérdida de 6q, 9p y 10) [6-8], mientras que se observaron cuatro nuevas alteraciones (ganancia del cromosoma 3 y 15, y pérdida de 1p36 y 14) que afectaban a más del 30% de melanomas estudiados. En este sentido, sería oportuno realizar estudios con muestras mayores, con el fin de cotejar los resultados obtenidos en este trabajo.

Todos estos hallazgos presentan una gran relevancia no solo a nivel diagnóstico, sino también a nivel terapéutico, pues el conocimiento de qué regiones genómicas se encuentran ganadas o perdidas en este tipo de tumor, podría ser utilizado, por ejemplo, en el desarrollo de fármacos dirigidos frente a proteínas que se encuentran codificadas por genes situados en dichas regiones. Por ejemplo, entre las regiones cromosómicas que se han visto ganadas en melanomas, se encuentra 8q, región citogenética en la que se localiza el protooncogén *MYC*, cuya sobreexpresión se ha relacionado con la metástasis de melanoma [19]. Con lo cual, una ganancia de esta región, podría provocar un aumento en la expresión de este protooncogén, por lo que su detección podría ser utilizada para tratar a los pacientes que la presenten con fármacos dirigidos contra esta diana, en lo que se conoce como medicina personalizada. Otro ejemplo de esto es la pérdida de 9p en melanomas. En esta región se encuentra el gen *CDKN2A*, que codifica para el supresor tumoral p16, cuya pérdida en melanoma se ha relacionado con un peor pronóstico de los pacientes que la sufren, por lo que conocer la pérdida de esta región cromosómica, podría emplearse para monitorizar su evolución [20]. Por consiguiente, sería interesante comprobar los niveles de expresión de estas proteínas, por técnicas como Western-Blot o inmunofluorescencia, en los tumores estudiados que presentaron dichas alteraciones.

En definitiva, el conocimiento de las alteraciones más frecuentes en el número de copias cromosómicas de melanomas, presenta una gran relevancia tanto a nivel de diagnóstico como en la búsqueda de marcadores y posibles dianas terapéuticas.

Del mismo modo, se analizó un nódulo proliferativo, con el objetivo de identificar las variaciones en el número de copias cromosómicas que presentaba. Los resultados confirmaron los hallazgos descritos en estudios anteriores [9], pues a diferencia de los melanomas, en los que se las aberraciones observadas fueron estructurales (ganancias y/o pérdidas de fragmentos cromosómicos), en el nódulo analizado se observó la ganancia de cromosomas completos (1, 2, 3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20 y 22).

Una vez corroboradas experimentalmente las alteraciones en el número de copias más frecuentes en melanomas, nódulos proliferativos y nevi, se trató de realizar una aproximación traslacional de la utilización de CGH en el análisis de ADN circulante tumoral. Para ello, se analizaron por CGH el plasma y tejido de dos pacientes con melanoma metastásico, con la finalidad de poder aplicar en un futuro los conocimientos hallados en clínica para diagnosticar y realizar seguimientos de la evolución de los pacientes que sufren de este tipo de tumor, con todas las ventajas que presenta la biopsia líquida [13, 15].

El primero de los pacientes, presentaba un melanoma que había metastatizado a múltiples órganos (piel, hígado, ganglios y huesos). Los resultados obtenidos por CGH mostraron múltiples alteraciones en el plasma, tales como la ganancia de los cromosomas 5p, 7q y 21, y la pérdida de 4q, 6q, 7p, 10, 12p y 14, además de la mutación de *BRAF* V600E. Por el contrario, aunque no se encontraron alteraciones claras en el tejido, se observó cierta tendencia en determinados cromosomas, como la ganancia del 5p, 6p y 7q o la pérdida del 4q. Con el fin de determinar la causa de las pocas alteraciones detectadas en tejido, se realizó un ensayo de FISH en el que se analizó la región cromosómica 6p. Se observó un 17% de células tumorales con ganancia de 6p, lo cual evidenció la baja carga tumoral existente en la muestra, siendo esta la posible causa de la baja frecuencia de aberraciones cromosómicas encontradas en tejido. Con todo esto, sería útil repetir el análisis con CGH, en caso de ser posible, seleccionando una región con mayor tejido tumoral.

Aunque las variaciones en el número de copias encontradas en tejido no fueron del todo claras, la tendencia observada en los cromosomas 4q, 5p y 7q, concordaba con las alteraciones obtenidas en plasma, lo cual validaría el análisis del ADN circulante de tumor mediante CGH como herramienta diagnóstica. No obstante, en el análisis del plasma, se observaron alteraciones extra que no aparecían en tejido. La explicación a esto podría ser la baja carga de tejido tumoral de la muestra utilizada evidenciada por FISH, e incluso podría deberse a la heterogeneidad tumoral. En este sentido, se ha visto que los tumores están formados por distintos clones celulares, que pueden dar lugar a metástasis polifiléticas, es decir, originadas por clones diferentes a partir del mismo tumor primario [21]. Como la muestra analizada procedía de un paciente que presentaba múltiples metástasis en diferentes órganos, las alteraciones observadas en el análisis de ADN circulante por CGH, podrían proceder de dichas metástasis. De este modo, sería útil analizar, en aquellos casos en los que fuese posible, el resto de tejidos afectados por la metástasis, y compararlos con los resultados obtenidos en el plasma examinado en este estudio, con el fin de dilucidar si las alteraciones observadas en este tenían su origen en dichas metástasis.

En el caso del segundo paciente, el análisis del plasma por CGH reflejó la ganancia de las regiones cromosómicas 3q y 8q, y la pérdida de 8p. En cuanto al análisis del tejido, los resultados obtenidos mostraron un gran número de alteraciones, tales como la ganancia del 1q, 8q y la pérdida de 8p, 9p, 10, 11q, 14, 16 y 20, así como la amplificación del protooncogén *MET* (7q). Además, se comprobó que *BRAF* se encontraba mutado tanto en plasma como en tejido y se observó cierta tendencia en determinados cromosomas, como la ganancia del 17q en plasma y tejido, y la pérdida de 11q en plasma.

Nuevamente, se encontró cierta semejanza en algunas de las alteraciones halladas en tejido y plasma (ganancia del 8q y pérdida del 8p y de 11q). Sin embargo, se detectaron alteraciones que no se correspondían entre ambas muestras. Esto podría explicarse, nuevamente, por la heterogeneidad tumoral. En este caso, las muestras comparadas fueron tomadas en distintos momentos de la enfermedad. El tejido fue obtenido a partir del tumor primario, por el que el paciente recibió tratamiento, mientras que el plasma se extrajo en años posteriores, en una recaída de este. Las diferencias encontradas, podrían deberse a que, al ser tratado, ciertos clones del tumor primario fueron eliminados, pero no todos, por lo que determinados clones que habrían permanecido remanentes causando las metástasis y recaídas posteriores. Para comprobar esto, sería oportuno, nuevamente, analizar los tejidos de las distintas metástasis y compararlos con los obtenidos en este estudio.

En definitiva, los hallazgos obtenidos mediante CGH en este trabajo ponen de manifiesto la utilidad de esta técnica como herramienta diagnóstica en lesiones melanocíticas (nevus y melanoma) histológicamente ambiguas, así como en la monitorización y en el seguimiento de la evolución de pacientes con melanoma metastásico a través del análisis del ADN circulante obtenido a partir de muestras de plasma. No obstante, debido al bajo número de muestras de plasma analizadas, se hace necesario continuar con el estudio de más casos con el fin de validar los resultados reflejados en este estudio y con vistas a su aplicación en el futuro en la práctica clínica. Asimismo, y puesto que los melanomas analizados presentaban *BRAF* mutado (*BRAF* V600E), sería conveniente ampliar la muestra, incluyendo a pacientes que no presentasen esta mutación y de los que a priori no se pudiera hacer seguimiento por biopsia líquida, con el propósito de comprobar la utilidad de esta técnica en dichos casos.

Referencias

1. Bastian, B.C. 2014. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Reviews Pathology*, 9:239-71
2. Herron, M.D., Vanderhooft, S.L., Smock, K., Zhou, H., Leachman, S.A. and Coffin, C. 2004. Proliferative nodules in congenital melanocytic nevi: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 28(8):1017-25.
3. DeSantis, C.E., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Siegel, R.L., Stein, K.D., Kramer, J.L., Alteri, R., Robbins, A.S. and Jemal, A. 2014. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *A Cancer Journal for Clinicians*, 64(4):252-71.
4. Potrony, M., Badenas, C., Aguilera, P., Puig-Butille, J.A., Carrera, C., Malveyh, J. and Puig, S. 2015. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Annals of Translational Medicine*, 3(15):210.
5. Arozarena, I. and Wellbrock, C. 2017. Targeting invasive properties of melanoma cells. *The FEBS Journal*, in <http://dx.doi.org/10.1111/febs.14040>.
6. North, J.P., Vemula, S.S. and Bastian, B.C. 2014. Chromosomal copy number analysis in melanoma diagnostics. *Methods in Molecular Biology*, 1102:199-226.
7. Bastian, B.C., LeBoit, P.E., Hamm, H., Bröcker, E.B. and Pinkel D. 1998. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Research*, 58(10):2170-5.
8. Bastian, B.C., Olshen, A.B., LeBoit, P.E. and Pinkel, D. 2003. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *The American Journal of Pathology*, 163(5):1765-70.
9. Bastian, B.C., Xiong, J., Frieden, I.J., Williams, M.L., Chou, P., Busam, K., Pinkel, D. and LeBoit, P.E. 2002. Genetic changes in neoplasms arising in congenital melanocytic nevi: differences between nodular proliferations and melanomas. *The American Journal of Pathology*, 161(4):1163-9.
10. Mesbah Ardakani, N., Thomas, C., Robinson, C., Mina, K., Harvey, N.T., Amanuel, B. and Wood, B.A. 2017. Detection of copy number variations in melanocytic lesions utilising array based comparative genomic hybridisation. *Pathology*, 49(3):285-291.
11. Wiesner, T., Kutzner, H., Cerroni, L., Mihm, M.C., Busam, K.J. and Murali, R. 2016. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology*, 48(2):113-31.
12. Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S. and Bardelli, A. 2017. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, in <https://www.nature.com/nrclinonc/journal/vaop/ncurrent/full/nrclinonc.2017.14.html>
13. Cheng, F., Su, L. and Qian, C. 2016. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30):48832-48841.
14. Schwarzenbach, H., Hoon, D.S. and Pantel, K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6):426-37.
15. Salvi, S., Gurioli, G., De Giorgi, U., Conteduca, V., Tedaldi, G., Calistri, D. and Casadio, V. 2016. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *OncoTargets and Therapy*, 25(9):6549-6559.
16. Molina-Vila, M.A., de-Las-Casas, C.M., Bertran-Alamillo, J., Jordana-Ariza, N., González-Cao, M. and Rosell, R. 2015. cfDNA analysis from blood in melanoma. *Annals of Translational Medicine*, 3(20):309.
17. Vergier, B., Prochazkova-Carlotti, M., de la Fouchardière, A., Cerroni, L., Massi, D., De Giorgi, V., Bailly, C., Wesselmann, U., Karlseladze, A., Avril, M.F., Jouary, T. and Merlio, J.P. 2011. Fluorescence in situ hybridization, a diagnostic aid in ambiguous melanocytic tumors: European study of 113 cases. *Modern Pathology*, 24(5):613-23
18. Gerami, P., Wass, A., Mafee, M., Fang, Y., Pulitzer, M.P. and Busam, K.J. 2009. Fluorescence in situ hybridization for distinguishing nevoid melanomas from mitotically active nevi. *The American Journal of Surgical Pathology*, 33(12):1783-8
19. Lin, X., Sun, R., Zhao, X., Zhu, D., Zhao, X., Gu, Q., Dong, X., Zhang, D., Zhang, Y., Li, Y. and Sun, B. 2017. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *Journal of Molecular Medicine*, 95(1):53-67.

20. Straume, O., Sviland, L. and Akslen, L.A. 2000. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clinical Cancer Research*, 6(5):1845-53.
21. McGranahan, N. and Swanton, C. 2017. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, 168(4):613-628.