



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
Departamento de Medicina. Programa de Doctorado 3139

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL
MELANOMA MALIGNO MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN
GENÉTICA Y EPIGENÉTICA**

Presentada por:

Blanca de Unamuno Bustos

Dirigida por:

Dr. Rafael Botella Estrada

Dra. Sarai Palanca Suela

Valencia, 2019



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
Departamento de Medicina. Programa de Doctorado 3139

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL
MELANOMA MALIGNO MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN
GENÉTICA Y EPIGENÉTICA**

Blanca de Unamuno Bustos. Licenciada en Medicina y Cirugía.

Directores de la Tesis

Dr. Rafael Botella Estrada

Dra. Sarai Palanca Suela

Valencia, 2019

D. RAFAEL BOTELLA ESTRADA, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de Dermatología en la Universidad de Valencia, y Jefe de Servicio de Dermatología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

“Caracterización molecular del melanoma maligno mediante una aproximación genética y epigenética”

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Medicina, Dña. Blanca de Unamuno Bustos.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 25 de junio de dos mil diecinueve.

Fdo: Dr. Rafael Botella Estrada

Dña. SARAI PALANCA SUELA, Doctora por la Universidad de Valencia, y Facultativo Adjunto del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

“Caracterización molecular del melanoma maligno mediante una aproximación genética y epigenética”

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Medicina, Dña. Blanca de Unamuno Bustos.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 25 de junio de dos mil diecinueve.

Fdo: Dra. Sarai Palanca Suela

A mis padres

A David y Eva

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a mis directores de tesis. Al Dr. Rafael Botella, por brindarme la oportunidad de emprender este proyecto, poner todos los medios necesarios a mi alcance, y contagiarme su interés en el estudio del melanoma. A la Dra. Sarai Palanca, por enseñarme qué es la investigación, por guiarme y motivarme de forma constante, por su apoyo, su paciencia y su amistad. A ambos les agradezco haber estado a mi lado tantos en los buenos como en los malos momentos.

A Rosa Murria, por su gran trabajo y dedicación a este proyecto, sin ella no hubiera sido posible llevarlo a cabo. Por trabajar a mi lado y enseñarme.

Al Dr. Pascual Bolufer, por abrirme las puertas de su Laboratorio. A TODO el personal del Laboratorio de Biología Molecular, por acogerme y hacerme sentir una más, por ayudarme siempre que lo he necesitado. Especial agradecimiento a Gema Pérez, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por enseñarme, y sobre todo, por su paciencia infinita.

A TODO el Servicio de Dermatología, médicos adjuntos, residentes, personal de investigación, personal de enfermería y personal administrativo. Porque todos ellos con su trabajo diario han posibilitado la realización de este proyecto. Especial agradecimiento a los facultativos adjuntos (Conrad, Mercedes, Miguel, Begoña, Inma, Isabel y Javi), por confiar en mí para llevar la consulta de melanoma,

por apoyar el proyecto desde el principio, y por favorecer mi incorporación al Servicio de Dermatología con el esfuerzo que ello conllevaba.

A Rosa Ballester, con la que he compartido los inicios de este proyecto. Por ayudarme a ponerlo en marcha, trabajar conmigo codo con codo y seguir colaborando desde el Hospital de La Plana. A Vicente Oliver, por su inestimable ayuda en la recogida de muestras. A Víctor Alegre, Vicente Sabater y Eduardo Nagore por colaborar en este proyecto.

Al Dr. José Vicente Castell, por confiar en mí y ayudarme cuando más lo necesité.

A los pacientes con melanoma, por contribuir de forma altruista a la realización de este proyecto. Porque la investigación en melanoma en gracias a ellos y para ellos.

A mi familia, a los que están y los que ya no están. A mis padres por darme todo que he necesitado, por su educación y sus sabios consejos. A mis hermanos, mis primos (que son como hermanos) y a mis sobrinos, por estar a mi lado. A mis suegros, por sus constantes ánimos.

A David, por su apoyo, su paciencia y su cariño. Por acompañarme en este largo recorrido, celebrando los buenos momentos y apoyándome en los malos. A Eva, por regalarme su sonrisa cada día.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de las siguientes ayudas:

1. **Instituto de Investigación Sanitaria del HUIP La Fe** por la concesión del contrato de post-residencia para el desarrollo del proyecto “Identificación y traslación clínica de biomarcadores moleculares mediante una aproximación de biología de sistemas en el melanoma maligno” (2014/0370).
2. **Instituto de Salud Carlos III**, por la concesión de los proyectos “Comprehensive, Integrative and Genomic Approach to the Understanding and Treatment of Cancer and Leukemia” (PIE13/00046) y “Mecanismos moleculares implicados en la expresión aberrante del gen hTERT en el melanoma maligno. Papel de la telomerasa en el fenómeno de regresión” (PI16/01559).
3. **La Conselleria de Educació, Investigació, Cultura y Deporte**, por la concesión del proyecto “Implicación de la telomerasa en la regresión espontánea del melanoma maligno. Estudio de microRNAs reguladores del gen *TERT* y su relación con la actividad telomérica” (GV/2016/064).

**"Solo el que ensaya lo absurdo es capaz de conquistar lo
imposible"**

Miguel de Unamuno (1904). *Vida de Don Quijote y Sancho*

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	5
Listado de tablas.....	7
Listado de figuras.....	10
INTRODUCCIÓN	15
1. Definición y epidemiología del melanoma	17
2. Clasificación y estadificación del melanoma	19
2.1. Clasificación clínico-patológica del melanoma	19
2.2. Clasificación TNM y estadificación del melanoma.....	22
3. Factores pronósticos del melanoma	27
4. Biología molecular del melanoma	36
4.1. Alteraciones genéticas	36
4.1.1. Alteraciones genéticas asociadas al riesgo del desarrollo del melanoma.....	36
4.1.2. Alteraciones genéticas clásicas asociadas al desarrollo y progresión del melanoma (“ <i>Biological drivers</i> ”).....	40
4.1.3. Nuevos oncogenes y genes supresores tumorales descritos en el melanoma.....	47
4.1.4. Clasificación genómica del melanoma.....	54
4.2. Alteraciones epigenéticas	56
4.2.1. Metilación en el promotor de genes supresores tumorales en el melanoma.....	57
4.2.2. Expresión de microRNAs en el melanoma	61
5. Métodos de diagnóstico utilizados en el abordaje molecular de las alteraciones genéticas en el melanoma	66
5.1. Métodos de diagnóstico convencionales.....	66
5.2. Secuenciación masiva o <i>next-generation sequencing</i>	77
5.2.1. Metodología de la secuenciación masiva	77
5.2.2. Principales plataformas de secuenciación masiva.....	81
5.2.3. Aplicaciones de la secuenciación masiva.....	84

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	87
MATERIAL Y MÉTODOS	93
1. Material	95
1.1 Selección de pacientes.....	95
1.2 Muestras a estudio.....	96
2. Métodos	98
2.1 Plan de trabajo	98
2.2 Extracción de ácidos nucleicos	100
2.2.1 Extracción de ADN.....	100
2.2.2 Extracción de ARN.....	101
2.2.3 Cuantificación y valoración de la calidad de los ácidos nucleicos.....	102
2.3 Estudios genéticos	103
2.3.1 Estudio de alteraciones moleculares mediante secuenciación masiva.....	104
2.3.1.1 Selección de genes y diseño del panel.....	104
2.3.1.1.1 Selección de genes.....	104
2.3.1.1.2 Diseño del panel.....	105
2.3.1.2 Preparación de librerías.....	107
2.3.1.2.1 Amplificación.....	107
2.3.1.2.2 Digestión de los cebadores.....	108
2.3.1.2.3 Ligación de adaptadores y purificación de las librerías.....	109
2.3.1.2.4 Ecuilibración o normalización de la concentración de las librerías.....	110
2.3.1.3 Amplificación clonal y enriquecimiento.....	111
2.3.1.4 Secuenciación.....	114
2.3.1.5 Análisis bioinformático.....	115
2.3.1.6 Estudios de sensibilidad.....	115
2.3.1.7 Clasificación de las variantes identificadas.....	116
2.3.1.8 Confirmación de las mutaciones identificadas.....	118
2.3.2 Estudio de mutaciones mediante PCR en tiempo real.....	119
2.3.2.1 Estudio de mutaciones mediante sistema de mutación refractario a la amplificación por PCR o ARMS-PCR.....	119
2.3.2.2 Estudio de mutaciones mediante análisis de curvas de fusión de alta resolución.....	123
2.3.3 Estudio de mutaciones mediante secuenciación de Sanger.....	126
2.4 Estudios epigenéticos	129
2.4.1 Detección de la metilación de promotores mediante amplificación múltiple empleando sonda dependiente de ligación sensible a metilación (MS-MLPA).....	129
2.4.2 Expresión de miRNAs.....	136

2.4.2.1	Análisis de expresión de miRNAs mediante <i>arrays</i> . Selección de una firma epigenética.....	137
2.4.2.2	Estudio de la expresión de miRNAs mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Validación de la firma epigenética.....	138
2.4.2.2.1	Transcripción reversa (RT)	139
2.4.2.2.2	Cuantificación relativa de la expresión de miRNAs mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	140
3.	Análisis estadístico de los datos	142

RESULTADOS..... 143

1. Estudios genéticos 145

1.1. Estudio de alteraciones moleculares mediante secuenciación masiva..... 145

1.1.1. Selección de genes y diseño del panel 145

1.1.2. Métricas de calidad del panel y estudio de sensibilidad..... 147

1.1.3. Clasificación y confirmación de las variantes identificadas..... 149

1.1.3.1 Clasificación de las variantes identificadas 149

1.1.3.2 Confirmación de las variantes identificadas 150

1.2. Prevalencia de alteraciones moleculares en melanomas primarios .. 152

1.2.1. Prevalencia de mutaciones en genes clásicos del melanoma 153

1.2.2. Prevalencia de mutaciones en nuevos oncogenes y genes supresores tumorales..... 155

1.2.3. Prevalencia de alteraciones moleculares en genes asociados al melanoma familiar 157

1.2.4. Mutaciones concurrentes en los melanomas primarios 158

1.3. Asociación de las alteraciones moleculares con los parámetros clínico-patológicos..... 161

1.4. Asociación de las mutaciones con la supervivencia... .. 168

1.5. Clasificación molecular de los melanomas primarios atendiendo a los criterios de la TCGA..... 171

1.6. Prevalencia de las alteraciones moleculares en melanomas metastásicos 173

2. Estudios epigenéticos 176

2.1. Evaluación del estado de metilación de genes supresores tumorales 176

2.1.1. Estudio de sensibilidad analítica de los estudios de metilación mediante MLPA..... 176

2.1.2. Prevalencia de metilación de genes supresores tumorales en el melanoma. 179

2.1.3. Asociación de la metilación con los parámetros clínico-patológicos..... 180

2.1.4. Asociación de la metilación con otros parámetros moleculares..	181
2.1.5. Asociación de la metilación de TSGs con la supervivencia de pacientes con melanoma.....	185
2.2. Estudio de la expresión de microRNAs en el melanoma	188
2.2.1. Análisis de los perfiles de expresión de microRNAs mediante <i>arrays</i>	188
2.2.2. Selección de una firma de microRNAs con valor pronóstico en melanoma y su validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	192
2.2.3. Validación de los microRNAs más relevantes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	193
2.2.4. Estudio de la expresión de los microRNAs validados en nevus melanocíticos y melanomas metastásicos	197
DISCUSIÓN	199
1. Estudios genéticos	201
1.1. Diseño del panel de genes y métricas de calidad de la secuenciación masiva.....	201
1.2. Alteraciones moleculares en los melanomas primarios. Frecuencia de mutaciones y asociación a las características clínico-patológicas y supervivencia	205
1.3. Clasificación genómica de los melanomas primarios	217
1.4. Alteraciones moleculares en los melanomas metastásicos	218
2. Estudios epigenéticos	222
2.1. Detección de metilación en el promotor de genes supresores tumorales.....	222
2.2. Estudio de expresión de microRNAs	229
CONCLUSIONES	237
BIBLIOGRAFÍA	243
DOCUMENTOS ANEXOS	283

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNnc: ARN no codificante

α -KG: alfa-ketoglurato

BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela

Ct: Ciclo umbral

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

D-2HG: D-2-hydroxyglutarato

FC: Fold change

FDR: False Discovery Rate

FFPE: Formalin-fixed, Paraffin-embedded

FGM: fast-growing melanoma

HRM: High Resolution Melting

LMA: Leucemia mieloide aguda

LoD: Límite de detección (limit of detection)

MS-MLPA: Amplificación múltiple empleando sonda dependiente de ligación sensible a metilación.

NGS: Next Generation Sequencing

Non-FGM: non- fast-growing melanoma

PCA: Análisis de componentes principales

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGM: Personal Genome Machine

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

SG: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SNC: Sistema nervioso central

Listado de abreviaturas

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TE: Tris-EDTA

TIL`s: Tumor-infiltrating lymphocytes

TNM: Tumor, Node, Metastasis

TSG: Tumor Suppressor Gene

UNG: Uracil-N-Glycosylase

UV: Ultravioleta

VNC: Variación en el número de copias.

Wt: wild type

WES: whole exome sequencing

WGS: Whole genome sequencing

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1: Clasificación TNM
- Tabla 2: Estadificación del melanoma
- Tabla 3: Principales factores pronósticos independientes de supervivencia en el melanoma.
- Tabla 4: Mutaciones en el gen *BRAF* descritas en melanoma
- Tabla 5: Principales estudios de secuenciación masiva que reportan nuevos genes implicados en el melanoma.
- Tabla 6: Prevalencia de mutaciones en el promotor del gen *TERT* descritas en los diferentes estudios realizados en melanoma.
- Tabla 7: Prevalencia de mutaciones en el gen *IDHI* descritas en los diferentes estudios.
- Tabla 8: Principales miRNAs implicados en la patogenia del melanoma.
- Tabla 9: Principales métodos empleados para el estudio de mutaciones en el melanoma.
- Tabla 10: Principales plataformas de NGS.
- Tabla 11: Estudios de NGS con diseños de paneles específicos empleados en el estudio de melanomas.
- Tabla 12: A: Datos clínico-patológicos de los pacientes diagnosticados de melanoma. B: Datos clínico-patológicos de los pacientes diagnosticados de nevus melanocíticos.
- Tabla 13: Protocolo de PCR empleado para la amplificación de las librerías.
- Tabla 14: Programa de temperaturas de PCR empleado para la preparación de las librerías.
- Tabla 15: Programa de temperaturas empleado en el termociclador para la digestión de los cebadores remanentes.
- Tabla 16: Protocolo de trabajo seguido para la ligación de los adaptadores e identificadores.

Listado de tablas y figuras

- Tabla 17: Programa de temperaturas empleado para la ligación de los adaptadores e identificadores.
- Tabla 18: Protocolo de trabajo empleado para la ecualización de las librerías.
- Tabla 19: Programa de temperaturas empleado para la ecualización de las librerías.
- Tabla 20: Protocolo de trabajo empleado para PCR en emulsión.
- Tabla 21: Mutaciones en *KRAS* y *NRAS* detectadas por el kit.
- Tabla 22: Protocolo empleado para la PCR en tiempo real empleando el *AmoyDx® KRAS/NRAS Mutations Detection Kit*.
- Tabla 23: Protocolo empleado para la PCR en tiempo real empleando el *AmoyDx® KRAS/NRAS Mutations Detection Kit*.
- Tabla 24: Protocolo de trabajo empleado en la aproximación de HRM.
- Tabla 25: Programa de temperaturas utilizado en la aproximación de HRM.
- Tabla 26: Protocolo de trabajo para la amplificación con el *Type-it Mutation Detect PCR kit*.
- Tabla 27: Programa de temperaturas para la amplificación con el *Type-it Mutation Detect PCR kit*.
- Tabla 28: Parejas de cebadores empleados y temperaturas de hibridación correspondientes para la amplificación.
- Tabla 29: Protocolo de trabajo seguido para el MS-MLPA.
- Tabla 30: Programa de temperaturas empleado para el MS-MLPA.
- Tabla 31: Protocolo de trabajo de la RT.
- Tabla 32: Programa de temperaturas empleado para la RT.
- Tabla 33: Secuencias de los cebadores utilizados para el estudio de de los miRNAs candidatos mediante RT-qPCR.
- Tabla 34: Protocolo de trabajo de la RT-qPCR utilizada para la cuantificación relativa de la expresión de miRNAs

Listado de tablas y figuras

- Tabla 35: Programa de temperaturas de la RT-qPCR utilizada para la cuantificación relativa de la expresión de miRNAs.
- Tabla 36: Panel de genes diseñado para el abordaje molecular del melanoma mediante NGS.
- Tabla 37: Resultados de secuenciación masiva de las diluciones seriadas de ADN de ambas líneas celulares en dos experimentos independientes.
- Tabla 38: Mutaciones concurrentes identificadas en los genes *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *KIT* y *NF1*.
- Tabla 39: Asociación de las mutaciones con los parámetros clínico-patológicos en los melanomas primarios.
- Tabla 40: Asociaciones de las mutaciones en el promotor del gen *TERT* tras la estratificación de los melanomas en función del polimorfismo *rs2853669*.
- Tabla 41: Mutaciones identificadas en los genes *BRAF* y *NRAS* en las 12 muestras pareadas melanoma primario/metástasis de nuestra serie.
- Tabla 42: Mutaciones adicionales identificadas en las metástasis.
- Tabla 43: Ratios de metilación detectados con cada una de las sondas en las diluciones seriadas del estándar de ADN altamente metilado. Se muestran los resultados de metilación obtenidos por duplicado en cada dilución).
- Tabla 44: Asociación de la metilación en los genes *RARB*, *PTEN*, *APC*, *CDH13*, *ESR1* y *RASSF1* con las características clínico-patológicas y moleculares.
- Tabla 45: Selección de miRNAs diferencialmente expresados comunes entre las distintas variables de estudio.
- Tabla 46: Expresión media normalizada respecto a piel sana ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de los cuatro miRNAs seleccionados en función de las diferentes variables clínico-patológicas.
- Tabla 47: Expresión media normalizada respecto a piel sana ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de miR-34a-5p, miR-130b-3p, y miR-138-5p en los grupos de estudio.

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1: Clasificación clásica del melanoma en cuatro subtipos.
- Figura 2: Supervivencia de los pacientes con melanoma en estadios I-IV.
- Figura 3: Fenómeno de regresión.
- Figura 4: Tasas de supervivencia en función del estado de los ganglios linfáticos regionales.
- Figura 5: Regulación del ciclo celular mediante las dos proteínas codificadas por el gen *CDKN2A* (P16INK4A y P14ARF).
- Figura 6: Vías MAPK y fosfatidilinositol- 3-quinasa (PI3K)-AKT.
- Figura 7: Principales mecanismos epigenéticos.
- Figura 8: Mecanismo de regulación de la expresión génica de la metilación del ADN.
- Figura 9: Biogénesis de los miRNAs y mecanismo de regulación de la expresión génica postranscripcional mediante la complementariedad con el ARNm.
- Figura 10: Representación del método de Sanger automatizado.
- Figura 11: Representación de la amplificación mediante PCR.
- Figura 12: Representación de la detección de mutaciones mediante PCR alelo-específica.
- Figura 13: Representación esquemática del método HRM.
- Figura 14: Representación del método de detección de mutaciones mediante pirosecuenciación.
- Tabla 15: Flujo de trabajo utilizado en los estudios de secuenciación masiva.
- Figura 16: Representación esquemática de la amplificación mediante PCR en emulsión (A) y PCR puente (B)

Listado de tablas y figuras

- Figura 17: Reacción de secuenciación llevada a cabo por el método Illumina.
- Figura 18: Reacción de secuenciación llevada a cabo por el Ion Torrent.
- Figura 19: Circuito de trabajo para los estudios moleculares.
- Figura 20: Ejemplo de diseño del panel proporcionado por la herramienta *Ampliseq Designer*.
- Figura 21: Diagrama de flujo utilizado para la preparación de librerías.
- Figura 22: Representación esquemática de la PCR en emulsión.
- Figura 23: Esquema del método de secuenciación por semiconductores.
- Figura 24: Flujo de trabajo seguido para la selección y clasificación de las variantes patogénicas.
- Figura 25: Fundamento de la tecnología ARMS-PCR.
- Figura 26: Imagen correspondiente a las curvas de amplificación mediante *AmoyDx® NRAS Mutations Detection Kit*.
- Figura 27: Estudio de mutaciones en los genes *BRAF* (A) e *IDH1* (B) mediante HRM.
- Figura 28: Etapas del método de MLPA
- Figura 29: Diagrama de flujo para el estudio de metilación MS-MLPA.
- Figura 30: Análisis de los resultados de metilación mediante el *software* Coffalyser.
- Figura 31: Diagrama de flujo seguido para el estudio de expresión de miRNAs.
- Figura 32: Diagrama de flujo utilizado para el análisis de expresión de miRs mediante *arrays* de expresión.

Listado de tablas y figuras

- Figura 33: Representación gráfica de las métricas de calidad obtenidas en la secuenciación de las 130 muestras de melanoma FFPE.
- Figura 34: Visualización de la mutación p.Val600Glu en el gen *BRAF* mediante el software IGV. En el recuadro amarillo se especifica el número total de lecturas y número de lecturas de cada nucleótido (A, C, G, T) para esa posición cromosómica.
- Figura 35: Prevalencia de mutaciones en los genes estudiados.
- Figura 36: Prevalencia y espectro mutacional del gen *BRAF*.
- Figura 37: Prevalencia y espectro mutacional del gen *NRAS*.
- Figura 38: Prevalencia y espectro mutacional del gen *KIT*.
- Figura 39: Prevalencia y espectro mutacional del gen *TERT*.
- Figura 40: Prevalencia y espectro mutacional del gen *MC1R*.
- Figura 41: Diagrama de circos que muestra la concurrencia mutacional detectada en los melanomas de nuestra serie (n=118).
- Figura 42: Variación en el número de genes mutados en función de la localización anatómica.
- Figura 43: Mutaciones identificadas en los oncogenes *BRAF*, *NRAS* y *KIT* en nuestra serie de melanomas (n=118) en función de las diferentes localizaciones anatómicas.
- Figura 44: Representación del análisis multivariante de las mutaciones en el promotor del gen *TERT* mediante regresión logística.
- Figura 45: Análisis univariante de SLE (A) y SG (B) mediante el método de Kaplan-Meier con las mutaciones en el promotor del gen *TERT*.
- Figura 46: Análisis univariante de SLE (A y B) y SG (C y D) mediante el método de Kaplan-Meier con las mutaciones en el promotor del gen *TERT* estratificando los melanomas en función de la presencia o ausencia del polimorfismo *rs2853669*.

Listado de tablas y figuras

- Figura 47: Clasificación molecular de los melanomas atendiendo a los criterios definidos por la TCGA.
- Figura 48: Análisis comparativo que muestra los porcentajes de metilación obtenido mediante el software Coffalyser en las diluciones seriadas del estándar de ADN metilado.
- Figura 49: Frecuencia de metilación en los 24 TSGs.
- Figura 50: Análisis univariante de SLE mediante el método de Kaplan-Meier con los genes *RARB* (A), *PTEN* (B) y *CDH13* (C).
- Figura 51: Análisis univariante de SG mediante el método de Kaplan-Meier con los genes *RARB* (A), *PTEN* (B) y *CDH13* (C).
- Figura 52: Representación del análisis multivariante de SLE (A) y SG (B) mediante regresión de Cox incluyendo la metilación en los genes *RARB*, *PTEN* y *CDH13* junto con las principales variables con valor pronóstico en el melanoma
- Figura 53: Resultados del perfil de expresión de 101 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del índice de Breslow.
- Figura 54: Resultados del perfil de expresión de 79 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del índice de la ulceración.
- Figura 55: Resultados del perfil de expresión de 78 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del índice de las mitosis.
- Figura 56: Resultados del perfil de expresión de 76 miRNAs en 22 melanomas primarios en función de la regresión.
- Figura 57: Resultados del perfil de expresión de 117 miRNAs en 22 melanomas primarios en función de la tasa de crecimiento.
- Figura 58: Resultados del perfil de expresión de 97 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del estado mutacional del gen *TERT*.
- Figura 59: Los gráficos de dispersión muestran los niveles de expresión relativos ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de miR-138-5p y miR-130b-3p

Listado de tablas y figuras

en 179 melanomas primarios, y su asociación con las características clínico-patológicas y moleculares.

- Figura 60: Los gráficos de dispersión muestran los niveles de expresión diferencial de miR-34a-5p (A), miR-130b-3p (B), y miR-138-5p (C) entre nevos melanocíticos, melanomas primarios y melanomas metastásicos.

INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA

El melanoma maligno es una proliferación neoplásica originada a partir de la transformación maligna de los melanocitos como consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas adquiridas y/o heredadas. El melanocito, que deriva de células pluripotenciales de la cresta neural, migra hacia la epidermis, la úvea y el folículo piloso durante la embriogénesis. Su principal papel es la producción de melanina, que protege al ADN de las células de la piel contra el daño producido por la radiación ultravioleta (UV).

Más del 90% de los melanomas primarios se localizan en la piel, y con mucha menor frecuencia en mucosas, retina y tracto uveal, oído interno, y sistema nervioso central. Aunque se presenta en individuos de cualquier edad, su incidencia aumenta progresivamente hasta los 50 años, con una curva bimodal entre los 40 y 55 años, y a partir de los 70. El desarrollo de un melanoma es infrecuente durante la infancia (1-4% del total de melanomas) (Sáenz *et al.*, 2005).

El melanoma representa menos del 5% del total de cánceres cutáneos; sin embargo, en los últimos años se ha producido un crecimiento exponencial de su incidencia en Europa, Estados Unidos y Canadá (Apalla *et al.*, 2017). De hecho, el ritmo anual de crecimiento se sitúa en un 3-7% en los países de raza blanca (Diepgen *et al.*, 2002). A nivel mundial, las tasas de incidencia más altas se encuentran en Australia y Nueva Zelanda, con cifras de hasta 50 casos

Introducción

por 100.000 habitantes/año. En Europa la incidencia varía mucho en función de los países, con mayores tasas en los países del norte de Europa (en torno a 20 casos por 100.000 habitantes/año). Estas diferencias se basan por un lado en la distinta localización geográfica de los países dentro de Europa, pero también en las diferencias de los sistemas nacionales de registro. En España, aunque son escasos los datos al respecto, un metaanálisis reciente ha descrito tasas de incidencia global de melanoma invasivo de 8,76 casos por cada 100.000 habitantes al año (Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2016); si bien en determinadas regiones como la mediterránea se han registrado incidencias de 17,5 casos por 100.000 habitantes al año (Fernández-Canedo *et al.*, 2014).

Con respecto a la mortalidad, el melanoma es el responsable de más del 90% de las muertes producidas por cáncer de piel. En los últimos años, la tasa de mortalidad por melanoma ha aumentado, sin embargo este aumento ha resultado menos elevado que el de la incidencia. Las tasas de mortalidad más altas se registran en Australia/Nueva Zelanda (3,5 por 100.000 habitantes), seguido de Estados Unidos (1,7 por 100.000 habitantes) y Europa (1,5 por 100.000 habitantes). Concretamente en España, las muertes por melanoma suponen el 2% de las muertes por cáncer (Bosetti *et al.*, 2004), con una tasa de mortalidad de 1,76 por 100.000 habitantes en varones y de 1,26 por 100.000 habitantes en mujeres (Sáenz *et al.*, 2005).

2. CLASIFICACIÓN Y ESTADIFICACIÓN DEL MELANOMA

2.1. CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DEL MELANOMA

La clasificación clásica del melanoma establece cuatro subtipos principales: melanoma de extensión superficial (MES), melanoma nodular (MN), léntigo maligno melanoma (LMM), y melanoma lentiginoso acral (MLA) (Figura 1) (Clark *et al.*, 1986). Otros subtipos menos frecuentes incluyen el melanoma mucoso, el desmoplásico, el spitzoide y el tipo animal o equino. Esta clasificación se basa principalmente en la presentación clínica e histopatológica, y el patrón de crecimiento del melanoma; sin embargo, la utilidad de esta clasificación es limitada ya que de forma independiente carece de valor pronóstico.

La forma más frecuente es el MES, que representa el 70% de todos los melanomas cutáneos. Se diagnostica con mayor frecuencia entre los 30 y los 50 años. Clínicamente se presenta como una lesión de bordes irregulares, policromática, plana o ligeramente sobreelevada, en la que puede aparecer un nódulo. Aparece generalmente en áreas de exposición solar intermitente, siendo más frecuente en el tronco en los varones y en las extremidades inferiores en las mujeres. Se caracteriza por una primera fase de crecimiento radial, limitada a la epidermis o zonas focales de la dermis papilar; y en algunos casos por una segunda fase de crecimiento vertical, que

Introducción

clínicamente se asocia a la aparición de un nódulo sobre la lesión pigmentada plana.

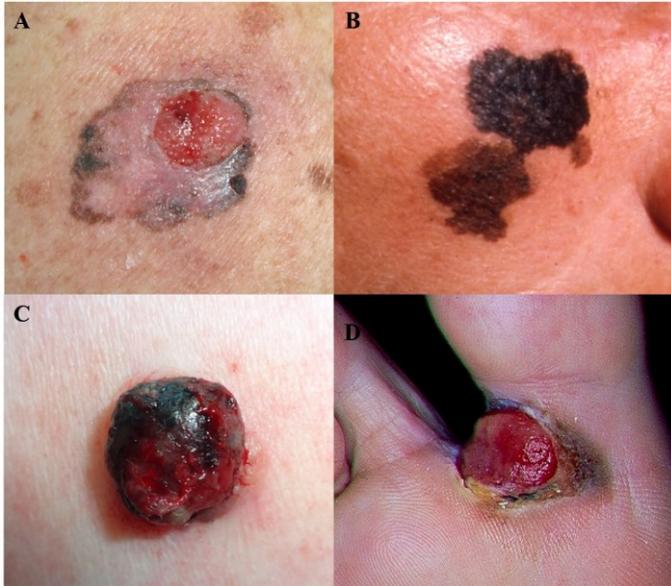


Figura 1: Clasificación clásica del melanoma en cuatro subtipos. A: MES; B: LMM; C: MN; D: MLA.

El MN es el segundo tipo más frecuente de melanoma, representando el 15-30%. Se localiza fundamentalmente en el tronco, extremidades superiores, cabeza y cuello. Se diferencia del MES en que no presenta la fase de crecimiento radial en más de tres procesos interpapilares. Desde el punto de vista clínico suele ser una lesión nodular azulada, negra o amelanótica, que en ocasiones se ulcera y presenta sangrado.

El LMM representa un 15% del total de los melanomas y suele presentarse en pacientes de edad más avanzada (generalmente de la sexta a la octava década de la vida). Es característica su localización en áreas de daño solar crónico, especialmente la cara. Evoluciona lentamente a lo largo de los años y se presenta como una lesión plana, asimétrica, mal delimitada y policromática. Se denomina lentigo maligno (LM) cuando es exclusivamente intraepidérmico, y lentigo melanoma maligno (LMM), cuando presenta también una fase de crecimiento vertical con invasión de la dermis.

El MLA es el tipo menos frecuente, constituyendo del 5 al 10% de todos los melanomas. Afecta típicamente a las palmas, plantas y aparato ungueal. Puede presentarse como una lesión macular pigmentada asimétrica, una pigmentación de la lámina ungueal, y, ocasionalmente, como un nódulo ulcerado amelanótico. Carece de relación con la exposición solar. Su incidencia es similar en todas las razas, pero dado que los grupos étnicos más pigmentados, africanos y asiáticos, no suelen desarrollar los otros tres tipos de melanoma que están relacionados con el daño solar, el MLA es el tipo más frecuente en estas razas (70% en la raza negra y 45% en asiáticos) (Nestle et al., 2004).

Introducción

2.2. CLASIFICACIÓN TNM Y ESTADIFICACIÓN DEL MELANOMA

El nuevo sistema de estadificación del melanoma se realiza siguiendo las recomendaciones establecidas por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC; 8ª edición) (Gershenwald *et al.*, 2017). La estadificación se basa en la clasificación TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) que incluye parámetros histopatológicos con valor pronóstico del tumor primario (T), la presencia de metástasis regionales (N), y/o la presencia de metástasis a distancia (M) (Tabla 1).

Clasificación del tumor primario (T):

Los principales criterios para la clasificación T del melanoma, son el índice de Breslow y la presencia de ulceración; siendo ambos los factores pronósticos más importantes del tumor primario. El índice de Breslow es considerado el factor pronóstico más relevante en el melanoma localmente invasivo. Su medición (en mm) se realiza desde la capa granulosa de la epidermis suprayacente o la base de la ulceración superficial hasta la porción más profunda de las células malignas que invaden la dermis (Breslow *et al.*, 1970). La presencia de ulceración histológica hace referencia a la pérdida total del grosor epidérmico inducida por el tumor subyacente. Es un factor pronóstico independiente que modifica significativamente la supervivencia asociada al melanoma. La octava edición de la AJCC ya no recomienda utilizar como criterios de estadificación otros parámetros del tumor primario incluidos en ediciones anteriores, como el nivel de

Clark y el índice mitótico (IM) (Balch *et al.*, 2001; Balch *et al.*, 2009; X). Ambos criterios han demostrado no ser un factor pronóstico independiente en el análisis multivariante (Gershenwald *et al.*, 2017).

La nueva clasificación también tiene en cuenta aquellos tumores en los que no ha sido posible medir correctamente el índice de Breslow (Tx), y a los melanomas primarios desconocidos o completamente regresados (T0).

Clasificación de la enfermedad linfática regional (N):

La clasificación N otorga información acerca del estado de los ganglios linfáticos regionales, así como de la presencia de metástasis intralinfáticas en forma de microsateletosis, sateletosis (a < 2 cm del tumor) y/o de metástasis en tránsito (a > 2 cm del tumor). Esta clasificación tiene en cuenta el número de ganglios regionales con metástasis y la carga tumoral en los ganglios, dividida como enfermedad “clínicamente detectable”, o macroscópica según la séptima edición de la AJCC, (afectación ganglionar clínicamente palpable o detectable en las pruebas de imagen, con/sin confirmación histológica) y “clínicamente oculta”, o microscópica según la séptima edición, (únicamente detectable mediante estudio histopatológico del ganglio centinela).

Introducción

Tabla 1: Clasificación TNM

T	Espesor tumoral (mm)	Ulceración
Tx	NA (El índice de Breslow no puede ser medido)	NA
T0	NA (No hay evidencia de tumor primario)	NA
Tis	NA (in situ)	NA
T1	≤1	
T1a	<0,8	sin ulceración
T1b	<0,8 0,8-1	con ulceración con/sin ulceración
T2	>1,0-2,00	
T2a	>1,0-2,00	sin ulceración
T2b	>1,0-2,00	con ulceración
T3	>2,0-4,0	
T3a	>2,0-4,0	sin ulceración
T3b	>2,0-4,0	con ulceración
T4	>4,0	
T4a	>4,0	sin ulceración
T4b	>4,0	con ulceración
N	No. de adenopatías metastásicas	Metástasis en tránsito/satelitosis
Nx	NA (no evaluado)	
N0	0	No
N1	1 o cualquier n° metástasis en tránsito/satelitosis	
N1a	1 clínicamente oculto (por BSGC)	No
N1b	1 clínicamente detectable	No
N1c	0	Sí
N2	2 ó 3 o múltiples múltiples metástasis en tránsito/satelitosis con 1 ganglio	
N2a	2 ó 3 clínicamente ocultos	No
N2b	2 ó 3 y al menos 1 clínicamente detectable	No
N2c	1 clínicamente oculto o clínicamente detectable	Sí
N3	4 o más, o 2 o más con cualquier n° metástasis en tránsito/satelitosis, o cualquier n° de ganglios adheridos con/sin metástasis en tránsito/satelitosis	
N3a	4 o más clínicamente ocultos	No
N3b	4 o más y al menos 1 clínicamente detectable o cualquier n° ganglios adheridos	No
N3c	2 o más clínicamente ocultos o clínicamente detectable o cualquier n° ganglios adheridos	Sí
M	Localización	Niveles de LDH en suero
M0	Sin metástasis a distancia	NA
M1	Evidencia de metástasis a distancia	
M1a	Metástasis ganglionares, cutáneas/subcutáneas o musculares a distancia	
M1a (0)		Normales
M1a (1)		Elevados
M1b	Metástasis pulmonares con/sin M1a	
M1b (0)		Normales
M1b (1)		Elevados
M1c	Metástasis viscerales fuera del SNC con/sin M1a o M1b	
M1c (0)		Normales
M1c (1)		Elevados
M1d	Metástasis en SNC con/sin M1a, M1b o M1c	
M1d (0)		Normales
M1d (1)		Elevados

NA: No aplicable; LDH: lactatodeshidrogenasa

Para la clasificación N está indicada la realización de la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC). Se recomienda en melanomas con índice de Breslow $\geq 0,8\text{mm}$. También debe considerarse en melanomas con índice de Breslow inferior a $0,8\text{mm}$ y otros factores de riesgo como la ulceración, la presencia de mitosis, la invasión linfovascular o la imposibilidad de medir correctamente el índice de Breslow debido a un margen profundo positivo (NCCN, 2019). Es una técnica ampliamente extendida en la estadificación del melanoma y otros tumores, que fue introducida por Morton *et al* en 1992 (Morton *et al*, 1992). Consiste en la identificación y el estudio histológico de uno o varios ganglios que reciben el drenaje linfático directo del tumor, permitiendo la detección de micrometástasis ganglionares regionales (Botella *et al.*, 2011).

Clasificación de las metástasis a distancia (M):

La clasificación M se refiere a la presencia de metástasis a distancia. Tiene en cuenta no sólo la localización de las metástasis, sino también los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero, ya que existen diferencias significativas en las tasas de supervivencia global (SG) en pacientes con estadio IV en presencia de niveles elevados de LDH (Balch *et al.*, 2009).

Introducción

Estadificación del melanoma

La clasificación TNM permite diferenciar cinco estadios: 0 (melanoma *in situ*), I y II (enfermedad localizada), III (enfermedad con afectación locorregional) y IV (enfermedad con afectación a distancia) (Tabla 2). El estadiaje clínico hace referencia al estudio histopatológico del melanoma primario y la evaluación clínico/radiológica de las metástasis; mientras que el estadiaje patológico incluye el estudio histopatológico del tumor primario y de los ganglios linfáticos regionales tras la BSGC y/o la linfadenectomía, así como la evaluación clínico/radiológica de las metástasis.

Tabla 2: Estadificación del melanoma

Estadio clínico				Estadio patológico			
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Cualquier T	≥N1	M0	IIIA	T1a/b-T2a	N1a o N2a	M0
					T0	N1b, N1c	M0
				IIB	T1a/b-T2a	N1b/c o N2b	M0
					T2b/T3a	N1a-N2b	M0
					T0	N2b, N2c, N3b o N3c	M0
				IIC	T1a-3a	N2c o N3a/b/c	M0
					T3b/T4a	≥N1	M0
					T4b	N1a-N2c	M0
				IIID	T4b	N3a/b/c	M0
				IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

3. FACTORES PRONÓSTICOS DEL MELANOMA

El pronóstico de un paciente con melanoma depende del estadio en el que se encuentre en el momento del diagnóstico. Así, la supervivencia varía mucho de unos estadios a otros, con tasas de SG a los 5 años del 97% en estadio I, pero con una reducción significativa en estadios avanzados, llegando a tasas de SG a un año del 33% en estadio IV (Figura 2) (Balch *et al.*, 2011).

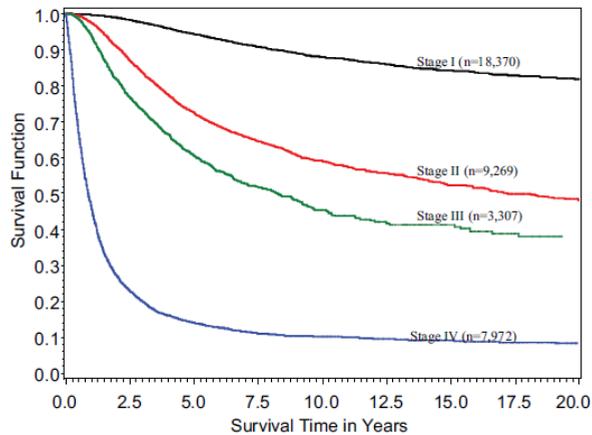


Figura 2: Tasas de SG de los pacientes con melanoma en estadios I-IV. Representa las tasas de supervivencia en los cuatro estadios obtenidas anteriormente a la aparición de las terapias dirigidas o la inmunoterapia. (Balch *et al.*, 2011).

Además de los parámetros incluidos en la clasificación TNM, existen otras características clínico-patológicas y moleculares que también han demostrado tener valor como factores pronósticos independientes (tabla 3).

Introducción

Edad

La edad se asocia de forma independiente a menores de tasas de supervivencia, con peor pronóstico a mayor edad (Austin *et al.*, 1994; Balch *et al.*, 2001; Leiter *et al.*, 2004; Balch *et al.*, 2013). Por el momento se desconoce si las diferencias en supervivencia asociadas a la edad pueden deberse a una menor tendencia a realizar tratamientos en pacientes de mayor edad, o bien a un comportamiento biológico distinto de los melanomas que afectan a este subgrupo de población (Balch *et al.*, 2015).

Tabla 3: Principales factores pronósticos independientes de supervivencia en el melanoma.

Factor	Peor pronóstico
Edad	Mayor edad
Sexo	Varones
Localización anatómica	Localización en cabeza y cuello y tronco
Índice de Breslow	Mayor índice de Breslow
Ulceración	Presencia de ulceración
Mitosis	Alto índice mitótico
Linfocitos intratumorales	Ausencia de infiltrado linfocitario
Regresión	Ausencia de regresión
Tasa de crecimiento	Melanomas de rápido crecimiento
Nº ganglios linfáticos afectos	Mayor nº de metástasis ganglionares
Carga tumoral en los ganglios linfáticos	Mayor tamaño depósito metastásico
Localización del depósito en los ganglios linfáticos	Localización parenquimatosa
Localización de las metástasis a distancia	Metástasis viscerales
Alteraciones moleculares (mutaciones <i>pTERT</i> , metilación <i>PTEN</i> , infraexpresión miR-137, sobreexpresión de miR-10b)	Presencia de mutaciones y/o metilación, sobre/infraexpresión miRNAs

pTERT: Promotor del gen *TERT*

Sexo

Se ha demostrado que el sexo es un factor pronóstico independiente, con mayores tasas de supervivencia en mujeres (Masbäck *et al.*, 2001; Mervic *et al.*, 2011). En las mujeres los melanomas se presentan a una edad más temprana y son con mayor frecuencia melanomas de espesor fino (<1mm de Breslow), no ulcerados y localizados en extremidades (Scoggins *et al.*, 2006).

Lugar anatómico del tumor primario

Los melanomas localizados en cabeza y cuello, y en el tronco podrían presentar un peor pronóstico. Los melanomas de cabeza y cuello, a pesar de una menor tasa de positividad en la BSGC (comparado con extremidades y tronco), presentan tasas significativamente menores de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y SG a los cinco años (Fadaki *et al.*, 2013). Por su parte, los melanomas localizados en tronco, metastatizan más frecuentemente a distancia, mientras que los melanomas en extremidades lo hacen con mayor frecuencia en forma de satelitosis y/o metástasis en tránsito. Esta diferencia en la localización de las metástasis podría estar relacionada con una menor supervivencia en el subgrupo de melanomas en tronco (Leiter *et al.*, 2004).

Introducción

Índice de Breslow

Como ya se ha comentado, el índice de Breslow es el factor pronóstico más importante en el melanoma primario (Breslow *et al.*, 1970). Los melanomas finos (<1mm de Breslow) se consideran melanomas de buen pronóstico, mientras que los melanomas de >4mm de espesor tumoral son considerados melanomas gruesos con alto riesgo de metastatizar. Según las cifras aportadas por la AJCC, la tasa de supervivencia a los diez años en melanomas de <1mm es del 92%, en melanomas de entre 1-2mm del 63%, en melanomas de entre 2-4mm del 63% y en melanomas de >4mm del 50% (Balch *et al.*, 2009).

Ulceración

Tanto la presencia como la extensión de la ulceración han demostrado ser factores independientes de mal pronóstico (In 't Hout *et al.*, 2012; Gershenwald *et al.*, 2017). Cabe destacar que las tasas de supervivencia en pacientes con melanomas ulcerados resulta similar a la supervivencia de melanomas no ulcerados de la siguiente categoría T atribuida por el índice de Breslow (por ejemplo T2b y T3a).

Mitosis

El IM es el número de mitosis por milímetro cuadrado (mitosis/mm²) en la porción dérmica del melanoma, comenzando la medición en el campo con más mitosis (método de medición *hot spot*). Varios estudios han demostrado su valor pronóstico con menores tasas de supervivencia en melanomas con alto IM (Balch *et al.*, 2009;

Thompson *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha descrito su utilidad como factor predictor de positividad en la BSGC (Tejera-Vaquerizo A, 2015; Wat H, 2016; Tejera-Vaquerizo A, 2017), aunque se ha sugerido que podría perder su valor predictivo a medida que aumenta el espesor tumoral (Roach BA, 2010). A pesar de que no está incluido en la clasificación T de la octava edición de la AJCC, el comité de expertos de la AJCC recomienda recoger el IM en todos los melanomas primarios dado el mayor riesgo de positividad de la BSGC en melanomas con alto IM (Gershenwald *et al.*, 2017).

Infiltrado de linfocitos intratumorales (*Tumor-infiltrating lymphocytes: TILs*)

Los TILs representan la respuesta del sistema inmune a las células tumorales del melanoma. Se mide como la presencia de infiltrado linfocitario en la fase de crecimiento vertical del melanoma, y se categoriza en tres grados: *brisk* (intenso e intratumoral), *non-brisk* (moderado) y ausente. Se ha demostrado que el grado de infiltración de los TILs se correlaciona de forma inversamente proporcional al índice de Breslow, a la ulceración y al nivel de Clark. Asimismo, la presencia de TILs es un factor predictor independiente de mayor supervivencia específica de melanoma (Azimi *et al.*, 2012).

Introducción

Regresión

El fenómeno de regresión hace referencia a la desaparición espontánea de la porción dérmica del melanoma, que es progresivamente sustituida por un estroma fibroso, con melanófagos, infiltrado linfocitario y vasos neoformados (Figura 3). Se estima que ocurre en el 10-35% de los melanomas. (Requena *et al.*, 2009).

Se ha sugerido un origen inmunológico por el hecho de asociarse a un denso infiltrado inflamatorio (McGovern *et al.*, 1975), pero no se sabe si la inflamación motiva la desaparición del melanoma o es un simple epifenómeno como consecuencia de la apoptosis sufrida por los melanocitos mediante mecanismos moleculares hasta ahora no descritos. Paralelamente, también se ha propuesto la disfunción telomérica como mecanismo adicional para explicar el fenómeno de regresión (Bastian *et al.*, 2003; Pathak *et al.*, 2000).

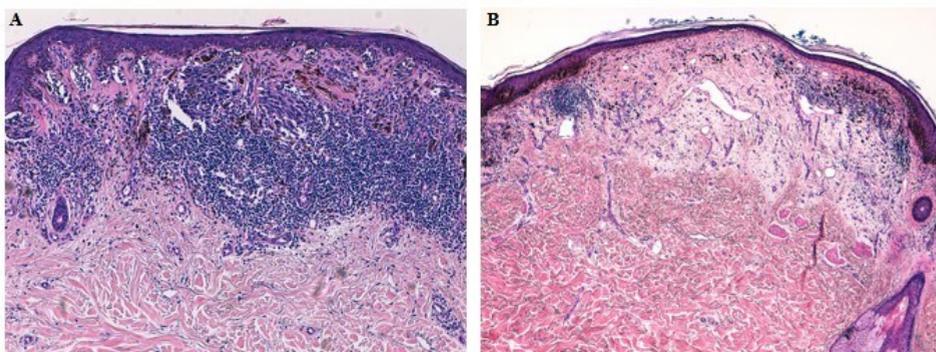


Figura 3: Fenómeno de regresión. Imágenes histológicas correspondientes a la fase temprana (A) y tardía (B) de regresión histológica.

El valor pronóstico de la regresión es un tema controvertido que ha sido objeto de análisis en diversos estudios. Anteriormente se consideraba un factor de mal pronóstico, asociado por un lado, al hecho de que en un melanoma con regresión no se puede descartar que el grosor del melanoma en el área regresada fuera en su inicio superior al que indica el índice de Breslow medible en el melanoma restante; y por otro lado, al resultado de varios estudios que han identificado una mayor capacidad metastásica en melanomas con presencia de regresión (Oláh *et al.*, 2003; Guitart *et al.*, 2002). Los estudios más recientes apuntan a que la regresión tiene un efecto protector, al haber observado un menor porcentaje de positividad en la BSGC en melanomas con regresión (Ribero *et al.*, 2013; Botella-Estrada *et al.*, 2014; Gualano *et al.*, 2017; Ribero *et al.*, 2019).

Tasa de crecimiento

Estudios recientes han demostrado que la tasa de crecimiento es un factor pronóstico independiente (Grob *et al.*, 2002; Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2010). La tasa de crecimiento se define como el incremento del espesor tumoral (medido en mm) en un periodo específico de tiempo (medido en meses). Se ha descrito un grupo de melanomas de crecimiento rápido (*fast-growing melanoma*; FGM) caracterizado por una mayor frecuencia de aparición en varones de edad avanzada, con localización preferente en tronco, subtipo MN, alto índice de Breslow, presencia de ulceración y mitosis, y con enfermedad locorregional en un alto porcentaje de pacientes (30-40%) (Liu *et al.*, 2006; Martorell *et al.*, 2011; Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2012).

Introducción

Afectación ganglionar linfática

El estado de los ganglios linfáticos regionales es el factor pronóstico independiente más importante en la supervivencia del melanoma (Gershenwald *et al.*, 1999; Stebbins *et al.*, 2011). Las tasas de supervivencia varían en función del número de ganglios afectados, con SG a los cinco años de un 84% en pacientes con sólo el ganglio centinela afecto (N1a), y del 64% en pacientes con metástasis en cuatro o más ganglios (N3b) (Gershenwald *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha reportado el impacto pronóstico de la carga tumoral (medida como la máxima dimensión del depósito metastásico en el ganglio) (Figura 4), de forma que pacientes con ganglios metastásicos “clínicamente ocultos” presentan mayores tasas de supervivencia que los pacientes con ganglios metastásicos “clínicamente detectables” (Balch *et al.*, 2010). De hecho, se ha demostrado que el pronóstico de los pacientes con baja carga tumoral en el ganglio centinela (<0.1 mm según los criterios de Rotterdam) es similar a los pacientes con negatividad en la BSGC (Van Akkooi *et al.*, 2008). Asimismo, se ha descrito el valor pronóstico de la localización anatómica del depósito tumoral en el ganglio centinela (criterios de Dewar), con peor pronóstico en la localización parenquimatosa comparada con la subcapsular (Dewar *et al.*, 2004).

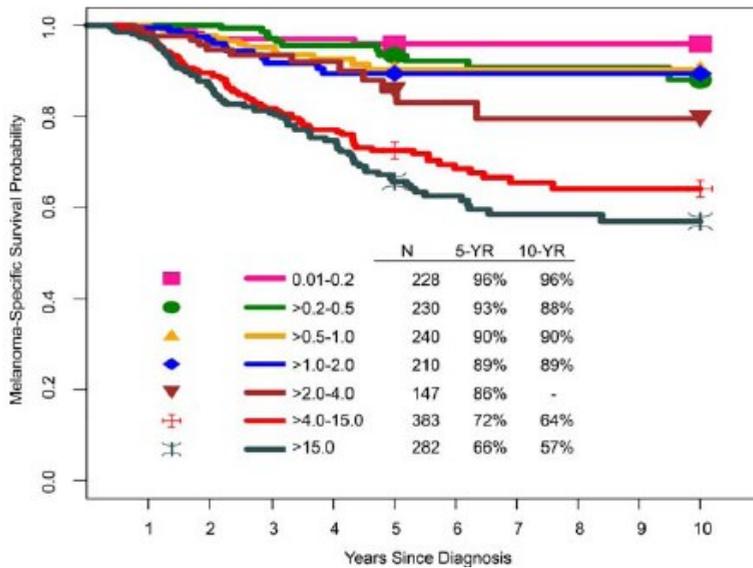


Figura 4: Tasas de supervivencia en función del tamaño del depósito tumoral en los ganglios linfáticos regionales. Tomada de Gershenwald JE *et al* (Gershenwald *et al.*, 2017)

Localización de las metástasis a distancia

La presencia de metástasis viscerales fuera del pulmón se asocia a menores tasas de SG comparado con la localización pulmonar, y cutánea o ganglionar a distancia (Gershenwald *et al.*, 2017).

Alteraciones moleculares

Estudios recientes han identificado alteraciones moleculares que podrían tener valor pronóstico en el melanoma. Dentro de las alteraciones genéticas, las mutaciones en el promotor del gen *TERT* se han asociado a menores tasas de SLE y SG (apartado 4.1.3). Con respecto a las alteraciones epigenéticas, se ha propuesto el valor

Introducción

pronóstico de la metilación en el promotor de diversos genes supresores tumorales (TSGs) entre los que destaca el gen *PTEN* (apartado 5.1); y adicionalmente, se ha sugerido la posible implicación pronóstica de la sobre/infraexpresión de determinados microRNAs (miRNAs) como el miR-137 o el miR-10b (apartado 5.2).

4. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL MELANOMA

4.1. ALTERACIONES GENÉTICAS

4.1.1. Alteraciones genéticas asociadas al riesgo del desarrollo del melanoma

Se estima que un 5-10% de los melanoma aparecen en un contexto familiar; y se caracterizan por la presencia de múltiples casos de melanoma en familiares consanguíneos, aparición de múltiples melanomas en un mismo individuo, y desarrollo en edades tempranas (Florell *et al.*, 2005). Se han descrito genes que confieren mayor riesgo de desarrollar un melanoma, que se encuentran implicados en la regulación del ciclo celular, el mantenimiento de los telómeros, y la regulación de la pigmentación y el número de nevus melanocíticos. Dichos genes se subdividen en genes de alta penetrancia (*CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1*, *TERT* y *POT1*), de penetrancia intermedia (*MC1R* y *MITF*) y de penetrancia baja (*ASIP*, *TYR*, *TYRP*, *OCA2*, *MATP*, *PAX2*, *GSTM1*, *CYP2D6*, *TNF*, *IL-9*, *IL-10*, y *SLC45A2*, entre otros).

CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

Fue el primer gen que se describió asociado al melanoma familiar (Hussussian et al., 1994), y posteriormente también se ha descrito su asociación al cáncer de páncreas (Goldstein et al., 2007). Es un TSG localizado en la región cromosómica 9p21, que está implicado en la regulación del ciclo celular. Se compone de cuatro exones y codifica para dos proteínas diferentes: el transcrito α , que codifica la proteína p16INK4A, y regula la salida de la fase G1 del ciclo celular inhibiendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma a través de CDK4; y el transcrito β , que codifica la proteína P14ARF y regula el ciclo celular a través de la proteína p53 (Ward et al., 2012) (Figura 5). Aproximadamente el 40% de los casos de melanoma familiar son portadores de mutaciones en la línea germinal en el gen *CDKN2A*. La mayor parte de las mutaciones identificadas se localizan en los exones 1 α y 2. La mutación más frecuentemente identificada en nuestro medio es la p.Gly101Trp (Ciotti et al., 2000).

CDK4 (cyclin-dependent kinase 4)

Es el segundo gen más importante en relación con el melanoma familiar. Es un oncogén localizado en la región cromosómica 12q14 que codifica para una de las proteínas que se unen a p16INK4A. La prevalencia de mutaciones en el contexto de melanoma familiar es aproximadamente del 2%. Únicamente se han descrito dos mutaciones afectando el mismo codón (p.Arg24His y p.Arg24Cys) (Ciotti *et al.*, 2000).

Introducción

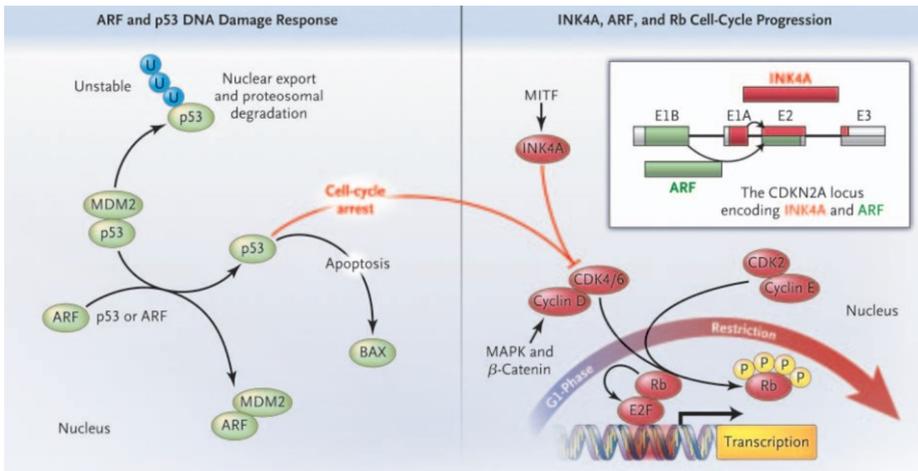


Figura 5: Regulación del ciclo celular mediante las dos proteínas codificadas por el gen *CDKN2A* (P16INK4A y P14ARF). Tomada de Miller *et al.* (Miller *et al.*, 2006).

BAP1 (BRCA1-associated protein 1)

Es un TSG localizado en la región 3p21. Recientemente se han descrito mutaciones en el gen *BAP1* en tumores spitzoides atípicos que se manifiestan clínicamente como lesiones papulares rosadas similares a nevus intradérmicos (conocidos como “bapomas”). Estas lesiones cutáneas forman parte del espectro clínico de un síndrome en el que hay un riesgo incrementado de desarrollar melanoma uveal, melanoma cutáneo, mesotelioma maligno y carcinoma renal (Wiesner *et al.*, 2011; Aoude *et al.*, 2015).

TERT (telomerase reverse transcriptase)

Se sitúa en la región 5p15.33 y codifica la subunidad catalítica de la enzima telomerasa, que se encarga del mantenimiento de los telómeros y de la regulación de la senescencia celular. Recientemente se ha descrito la implicación de las mutaciones en el promotor del gen *TERT* en el melanoma familiar y esporádico (Horn *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013). Concretamente, en relación con el melanoma familiar se ha descrito una mutación situada a 57 pares de bases del codón ATG (c.1-57).

MC1R (Melanocortin 1 receptor)

Se localiza en la región 16q24, y codifica para un receptor de la hormona estimuladora del melanocito ($MSH\alpha$). Es un gen altamente polimórfico en la población caucásica, que está implicado en la regulación de la pigmentación, controlando la producción de eumelanina (fotoprotectora)/ feomelanina (fotosensible y potencialmente mutagénica) (Ward *et al.*, 2012). Las variantes asociadas a mayor riesgo de desarrollo de melanoma son aquellas relacionadas con el fenotipo pelirrojo (*red hair color phenotype* - RHC): p.Aps84Glu, p.Arg142His, p.Arg151Cys, p.Ile155Thr, p.Arg160Trp, y p.Asp294His (Raimondi *et al.*, 2008, Potrony *et al.*, 2015). Otras variantes frecuentes pero con menor asociación al fenotipo RHC y al desarrollo de melanoma son la p.ValV60Leu, p.Val92Met, y p.Arg163Gln (Potrony *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha descrito la asociación significativa de la variante p.Arg163Gln con el melanoma tipo LMM (Córdoba-Lanus *et al.*, 2014).

Introducción

MITF (microphthalmia-associated transcription factor gene)

Se localiza en la región 3p14, y regula el desarrollo y diferenciación del melanocito. La presencia de mutaciones se asocia a mayor actividad transcripcional, hecho que a su vez conlleva mayor activación de otros genes. Recientemente se ha descrito su implicación en el melanoma familiar, con la presencia de mutaciones germinales en el 1,6%-2,8% de los pacientes con melanoma (Potrony et al., 2015). Varios grupos han identificado la variante p.Glu318Lys (*rs149617956*), y han descrito su asociación a características fenotípicas como la presencia de ojos de color azul y un mayor recuento de nevus; así como a mayor riesgo de desarrollo de melanoma y cáncer renal (Bertolotto et al., 2011; Yokoyama et al., 2011).

4.1.2. Alteraciones genéticas clásicas asociadas al desarrollo y progresión del melanoma (“Biological drivers”)

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas asociadas a la patogenia del melanoma. Estas alteraciones afectan a genes cuyas proteínas están implicadas en la transducción de señales, que incluyen la activación de receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) como el receptor KIT, así como la activación de las principales vías de señalización intracelular como la vía MAP-quinasa (MAPK- *Mitogen-activated protein kinase pathway*), también denominada vía RAS/RAF/MEK/ERK, y la vía *fosfatidilinositol- 3-quinasa* (PI3K)-AKT/mTOR (Figura 6). La activación de dichas vías de señalización

incrementa la transcripción de genes implicados en la proliferación y migración celular, permitiendo el desarrollo y la progresión del melanoma.

BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)

Es un oncogén localizado en la región cromosómica 7q34, que forma parte de la vía de señalización intracelular MAPK. Las mutaciones en el gen *BRAF* fueron descritas por primera vez por Davies *et al.*, y representan las mutaciones somáticas más prevalentes en el melanoma cutáneo (Davies *et al.*, 2002). Constituyen un evento oncogénico inicial en las lesiones melanocíticas, requiriéndose alteraciones moleculares adicionales para que se produzca la transformación maligna de las células (Shain *et al.*, 2015). Así, se ha descrito que el 80% de los nevus melanocíticos adquiridos presentan mutaciones en este gen (Pollock *et al.*, 2003).

Con respecto a los melanomas, el 40-60% son portadores de una mutación en el gen *BRAF*, siendo la más frecuente la p.ValV600Glu que resulta de la sustitución de una valina (Val) por un ácido glutámico (Glu) en el codón 600 del exón 15 [cambio de una timina por una adenina en la posición 1977 del ARN codificante (c.1799T>A)]. Esta mutación genera una conformación activa de la proteína, que tiene como consecuencia un incremento de la actividad quinasa 500 veces mayor que la proteína no mutada (Richtig *et al.*, 2017). La segunda mutación más frecuente es la p.Val600Lys, que aparece aproximadamente en el 2% de los melanomas, y también confiere alta actividad quinasa (Wan *et al.*, 2004). Además, el reciente

Introducción

desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación ha permitido la identificación de otras mutaciones menos frecuentes afectando codones distintos del 600. Estas mutaciones presentan menor actividad quinasa que las anteriormente descritas, por lo que las mutaciones en el gen *BRAF* se han clasificado como mutaciones de “alta actividad quinasa” y “baja actividad quinasa” (Tabla 4).

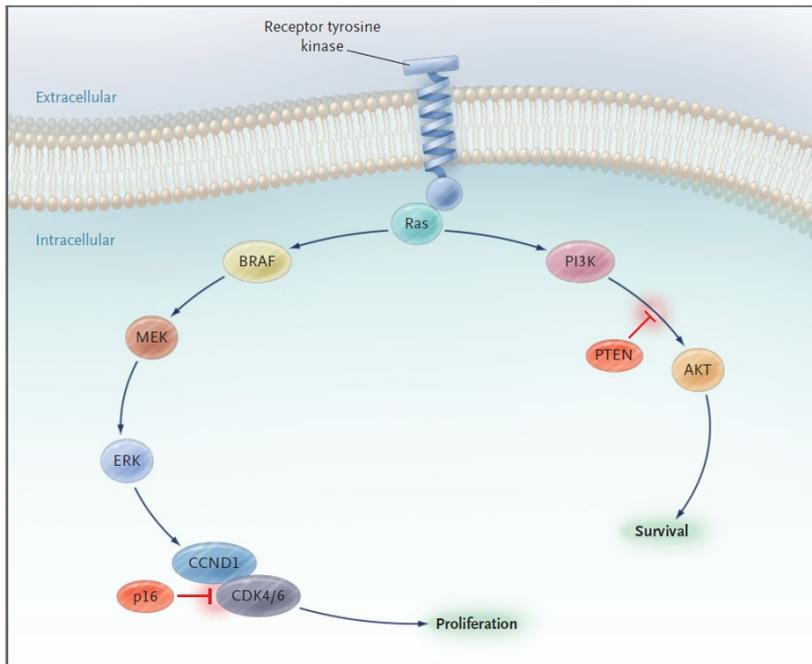


Figura 6: Vías MAPK y PI3K-AKT/mTOR. Tomada de Curtin *et al.* (Curtin *et al.*, 2005).

Las mutaciones en el gen *BRAF* presentan características clínico-patológicas diferenciales; así, clínicamente son frecuentes en melanomas localizados en áreas con exposición solar intermitente (sobre todo tronco), y en pacientes jóvenes. Desde el punto de vista histopatológico se ha descrito su asociación a melanomas ulcerados,

bien circunscritos, con engrosamiento de la epidermis en la fase de crecimiento radial, con abundantes células pagetoides, presencia de células grandes, redondas y pigmentadas en el infiltrado tumoral, y ausencia de elastosis solar (Broekaert *et al.*, 2010; Spathis *et al.*, 2019).

Tabla 4: Mutaciones en el gen *BRAF* descritas en melanoma. Modificada de Richtig *et al* (Richtig *et al.*, 2017).

Codón	Exón	Mutación	Prevalencia	Actividad quinasa	Codón	Exón	Mutación	Prevalencia	Actividad quinasa		
600	15	p.Val600Glu	95,93	Alta	464	11	p.Gly464Val	0,03	Alta		
		p.Val600Lys	1,88	Alta			p.Gly464Glu	0,03	Desconocida		
		p.Val600Arg	0,24	Alta			p.Gly464Arg	0,01	Alta		
		p.Val600Asp	0,07	Alta			596	15	p.Gly596Arg	0,02	Baja
		p.Val600Met	0,07	Alta					p.Gly596Asp	0,01	Desconocida
		p.Val600Leu	0,06	Alta			595	15	p.Phe595L	0,02	Alta
		p.Val600Ala	0,03	Alta					p.Phe595S	0,01	Desconocida
p.Val600Gly	0,03	Alta	211	5	p.Asp211Gly	0,01	Desconocida				
601	15	p.Lys601Glu	0,33	Alta	326	7	p.Ile326Thr	0,01	Desconocida		
		p.Lys601Asn	0,05	Alta	354	8	p.Arg354Gln	0,01	Desconocida		
		p.Lys601Gln	0,01	Alta	444	11	p.Arg444Trp	0,01	Desconocida		
594	15	p.Asp594Gly	0,19	Alta	467	11	p.Ser467Leu	0,01	Desconocida		
		p.Asp594Asn	0,09	Alta	468	11	p.Phe468Lue	0,01	Desconocida		
		p.Asp594Glu	0,01	Desconocida	471	11	p.Val471Phe	0,01	Desconocida		
		p.Asp594Lys	0,01	Desconocida	472	11	p.Tyr472Ser	0,01	Desconocida		
		p.Asp594Val	0,01	Baja	475	11	Lys475Arg	0,01	Desconocida		
469	11	p.Gly469Ala	0,15	Alta	584	15	p.Leu584Phe	0,01	Desconocida		
		p.Gly469Val	0,08	Desconocida	586	15	Glu586Lys	0,01	Alta		
		p.Gly469Arg	0,04	Desconocida	589	15	p.Thr589Ala	0,01	Desconocida		
		p.Gly469Glu	0,03	Baja	592	15	p.Ile592Met	0,01	Desconocida		
		p.Gly469Ser	0,01	Desconocida	598	15	p.Ala598Val	0,01	Alta		
		466	11	p.Gly466Val	0,07	Baja	599	15	p.Thr599Ile	0,01	Alta
				p.Gly466Glu	0,03	Baja	605	15	p.Ser605Gly	0,01	Desconocida
p.Gly466Ala	0,01			Alta	614	15	p.Ser614Pro	0,01	Desconocida		
p.Gly466Arg	0,01			Baja	615	15	p.Gly615Arg	0,01	Desconocida		
597	15			p.LGlu597Arg	0,05	Alta	616	15	p.Ser616Phe	0,01	Desconocida
		p.LGlu597Ser	0,05	Alta	618	15	p.Leu618Trp	0,01	Desconocida		
		p.LGlu597Gln	0,05	Alta			p.Leu618Ser	0,01	Desconocida		
		p.LGlu597Val	0,03	Alta			p.Leu618Ser	0,01	Desconocida		
581	15	p.Asn581Ser	0,05	Alta	637	15	P.Ser637Pro	0,01	Desconocida		
		p.Asn581Thr	0,01	Desconocida							

El descubrimiento de las mutaciones en el gen *BRAF* ha tenido una gran repercusión clínica, ya que ha permitido el desarrollo de nuevas moléculas que inhiben de forma selectiva la proteína BRAF

Introducción

(vemurafenib, dabrafenib, encorafenib), y que han demostrado incrementar la SLE y SG en los pacientes con melanoma (Chapman *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2015; Dummer *et al.*, 2018).

Familia RAS

La familia RAS engloba proteínas G reguladoras implicadas en la transducción de señales intracelulares en las vías MAPK y PI3K-AKT (Figura 6). Los tres principales oncogenes de la familia RAS son *NRAS* (1p13.2), *KRAS* (12p12.1) y *HRAS* (11p15.5). Las mutaciones en el gen *NRAS* constituyen las mutaciones somáticas “*driver*” más frecuentes en el melanoma tras las mutaciones en el gen *BRAF* (aproximadamente un 15-22% de los melanomas). En la mayor parte de los casos las mutaciones el gen *NRAS* son mutuamente excluyentes con las mutaciones en el gen *BRAF*. Menos frecuentes son las mutaciones en los genes *HRAS* y *KRAS*, que se han reportado en aproximadamente un 1-2% de los melanomas (Swick *et al.*, 2012). Asimismo, los nevus melanocíticos presentan mutaciones en la familia RAS, siendo características las mutaciones en el gen *NRAS* en los nevus congénitos, y en *HRAS* en los nevus de spitz (Tsao *et al.*, 2012).

Las mutaciones descritas en el gen *NRAS* se localizan en los codones 12 y 13 (20%) y en el codón 61 (80%), siendo las más frecuentes en melanoma la p.Gln61Arg y p.Gln61Lys (Reddy *et al.*, 2017). Se ha descrito su asociación a melanomas localizados en áreas de exposición solar intermitente, y a melanomas con mayor espesor tumoral, mayor índice mitótico y FGM (Woodman *et al.*, 2012;

Nagore *et al.*, 2013). Asimismo, se ha sugerido su posible valor pronóstico, al asociarse a melanomas con menores tasas de supervivencia (Devitt *et al.*, 2011).

KIT

Es un oncogén localizado en la región cromosómica 4q11 que codifica un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa. Cuando se une a un ligando extracelular activa su dominio intracelular, dando lugar a la activación de las vías MAPK y PI3K-AKT. Las mutaciones en el gen *KIT* determinan una activación constitutiva del receptor, y se han descrito en aproximadamente un 3% de los melanomas (Curtin *et al.*, 2006). Las series iniciales describieron mayor frecuencia de mutaciones en el gen *KIT* en los melanomas localizados en piel con daño solar crónico (28%), melanomas acrales (36%) y en melanomas de mucosas (39%) (Curtin *et al.*, 2006); sin embargo, series posteriores en otras áreas geográficas no han podido confirmar ese porcentaje tan elevado de mutaciones en melanomas con daño solar crónico (Handolias *et al.*, 2010). Las mutaciones se detectan en los exones 9 (2%), 11 (60-70%), 13 (15-20%), 17 y 18 (10-15%), siendo las más frecuentes las que afectan a los codones Leu576 y Lys642 (exón 11).

***GNAQ* (Guanine nucleotide-binding protein G(q) y *GNA11* (Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11)**

Ambos oncogenes codifican subunidades que forman parte de la familia de las proteínas G. El gen *GNAQ* se localiza en la región

Introducción

9q21 y el gen *GNA11* en la región 19p13.3. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las mutaciones en ambos genes conllevan una activación de la vía MAPK (Tsao *et al.*, 2012). Se asocian a la aparición de melanomas oculares; concretamente, se han descrito mutaciones mutuamente excluyentes entre ambos genes en aproximadamente el 80% de los melanomas uveales, 45% localizadas en el gen *GNAQ* y 32% en el gen *GNA11*. De forma adicional, se han descrito mutaciones en *GNAQ* y *GNA11* en el 55% y 7% de los nevus azules, respectivamente. En ambos genes, Las mutaciones se localizan en el exón 5 (p.Gln209Leu y p.Gln209Pro) y en el exón 4 (p.Arg183Cys y p.Arg183His) (Van Raamsdonk CD, 2010).

PTEN (Phosphatase and tensin homolog)

Es un TSG localizado en la región cromosómica 10q23.3, que actúa como regulador negativo de la vía PI3K-AKT/mTOR. La alteración de esta vía conlleva proliferación y supervivencia de las células neoplásicas, y frecuentemente se encuentra activada en concomitancia con la activación de la vía MAPK. Se ha descrito la pérdida de expresión del gen *PTEN* en aproximadamente el 30% de los melanomas (Wu *et al.*, 2003), fundamentalmente debida a deleciones cromosómicas o a mutaciones tipo *frameshift* (desplazamiento en el marco de lectura), o menos frecuentemente *missense* (de sentido erróneo o cambio de sentido). Estas mutaciones parecen ser mutuamente excluyentes a las mutaciones en el gen *NRAS* (Tsao *et al.*, 2000), sin embargo con frecuencia aparecen de forma concomitante a las mutaciones en el gen *BRAF* (Goel *et al.*, 2006). De hecho, estudios funcionales han demostrado la interacción genética

entre ambos genes en la progresión del melanoma (Dankort *et al.*, 2009).

Otras alteraciones moleculares menos frecuentes afectando a la vía PI3K/AKT/mTOR incluyen amplificaciones en los genes *AKT* y *PIK3CA* (Stahl *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2012); así como mutaciones puntuales en *PIK3CA*, que se encuentra raramente mutado en melanoma (en torno a un 3%) (Omholt *et al.*, 2006); en el gen *AKT*, que aparecen en aproximadamente el 1% de los melanomas (Davies *et al.*, 2008); y en otros genes menos frecuentes como *IRS4*, *mTOR*, *NFKB1*, *PIK3R1*, *PIK3R4*, y *PIK3R5* (Shull *et al.*, 2012).

4.1.3. Nuevos oncogenes y genes supresores tumorales descritos en el melanoma

Gracias al reciente desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación, en los últimos años se han identificado nuevos genes que podrían tener utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del melanoma (Tabla 5).

Uno de los genes más importantes descritos recientemente es el gen *TERT* (5p15.33). Las mutaciones en su promotor no sólo se han asociado a melanoma familiar (apartado 4.1.1), sino que también se han identificado en el melanoma esporádico (Horn *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013). Concretamente, se han descrito prevalencias variables que oscilan entre el 20% y el 80% (Tabla 6), por lo que junto con el gen *BRAF*, constituyen las mutaciones somáticas más frecuentes en el melanoma (Horn *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Heidenreich *et al.*,

Introducción

2014; Liao *et al.*, 2014; Pópulo *et al.*, 2014; Griewank *et al.*, 2014, Akbani *et al.*, 2015, Nagore *et al.*, 2016a; Nagore *et al.*, 2016b; Ekedahl *et al.*, 2016; Ofner *et al.*, 2017; Schwaederle *et al.*, 2017; Pellegrini *et al.*, 2017; Hugdahl *et al.*, 2017). Estudios funcionales han demostrado que la presencia de estas mutaciones en el promotor conlleva mayor expresión génica debido a la creación de nuevos sitios de unión para los factores de transcripción de la familia ETS (Horn *et al.*, 2013; Heidenreich *et al.*, 2014a; Bell *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016). Asimismo, diversos estudios en melanoma esporádico han reportado que las mutaciones en el promotor del gen *TERT* se asocian a características de mayor agresividad en el melanoma, como un mayor índice de Breslow, ulceración, presencia de mitosis, y subtipo histológico nodular (Heidenreich *et al.*, 2014a; Pópulo *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que dichas mutaciones son un factor pronóstico independiente, que se asocian a menor SLE y SG (Griewank *et al.*, 2014; Nagore *et al.*, 2016).

Otro de los genes más relevantes que se ha descrito en los últimos años en melanoma es el gen *NF1* (17q11.2). Es un TSG que actúa como regulador negativo de la vía MAPK, mediante su interacción con la proteína RAS (Krauthammer *et al.*, 2015). Se han reportado mutaciones a lo largo de todo el gen, con una prevalencia aproximada del 13-17%, según las series (Zhang *et al.*, 2016). Se ha descrito su asociación a melanomas en áreas fotoexpuestas, en pacientes varones, de mayor edad, y en un alto porcentaje de melanomas del subtipo desmoplásico (Wiesner *et al.*, 2015; Cirenajwis *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha descrito su posible

implicación como mecanismo de resistencia a las actuales terapias dirigidas con inhibidores de BRAF (Nissan *et al.*, 2014).

Tabla 5: Principales estudios de secuenciación masiva que reportan nuevos genes implicados en el melanoma. Modificada de Zhang T *et al* (Zhang *et al.*, 2016).

Autores	Análisis	N° muestras	Tipo muestras	Nuevos Genes identificados
Wei X <i>et al</i> , 2011	WES	14	Metástasis	<i>GRIN2A, TRRAP</i>
Stark M <i>et al</i> , 2011	WES	8	Líneas celulares	<i>MAP3K5, MAP3K9</i>
Nikolaev S <i>et al</i> , 2011	WES	7	Líneas celulares	<i>MAP2K1, MAP2K2</i>
Berger M <i>et al</i> , 2012	WGS	23	Metástasis	<i>PREX2</i>
Hodis E <i>et al</i> , 2012	WES	121	Tumores primarios Metástasis Líneas celulares	<i>RAC1, PPP6C, ARID2, STK19, IDH1, SNX31, TACC1</i>
Krauthammer M <i>et al</i> , 2012	WES	73	Metástasis Líneas celulares	<i>RAC1, PPP6C, ARID2, DCC, PTPKR</i>
Huang F <i>et al</i> , 2013	WGS	70	Tumores primarios Metástasis Líneas celulares	<i>TERT</i>
Horn S <i>et al</i> , 2013	WES	77	Tumores primarios	<i>TERT</i>
Mar VJ <i>et al</i> , 2013	WES	34	Tumores primarios	<i>NF1, NOTCH1</i>
Gartner <i>et al</i> , 2013	WGS/WES	29	Metástasis	<i>BCL2L1L2</i>
Aydin I <i>et al</i> , 2014	WES	8	Metástasis	<i>FBXW7</i>
Wong S <i>et al</i> , 2015	WES	20	Líneas celulares	<i>RQCD1</i>
Ding L <i>et al</i> , 2015	WGS	13	Metástasis	<i>EPHA3</i>
TCGA, 2015	WES	331	Tumores primarios Metástasis	<i>ARID2, IDH1, PPP6C, DDX3X, RAC1, MAP2K1, NF1, RB1</i>
Krauthammer M <i>et al</i> , 2015	WES	213	Tumores primarios Metástasis Líneas celulares	<i>NF1, RASA2, PTPN11, SOS1, IDH1, RAF, SPRED1</i>
Shain A <i>et al</i> , 2015	WGS/WES	20	Tumores primarios	<i>NFKBIE, CBL, CH2, FSIP1, ARID1A, PAK3, IL36A</i>
Arafeh R <i>et al</i> , 2015	WGS/WES	501	Líneas celulares	<i>RASA2, SETD2</i>
Akbani R <i>et al</i> , 2015	WES	320	Tumores primarios Metástasis	<i>RAC1, PPP6C, ARID2, NF1, IDH1, RB1, DDX3X, MRPS31, RPS27</i>
Hayward N <i>et al</i> , 2017	WGS	183	Tumores primarios Metástasis Líneas celulares	<i>ARID2, CWH43, NF1, SF3B1</i>
Hintzsche J <i>et al</i> , 2017	WES	19	Tumores primarios	<i>SF3B1</i>

WGS: *Whole genome sequencing*; WES: *Whole exome sequencing*.

Introducción

Tabla 6: Prevalencia de mutaciones en el promotor del gen *TERT* descritas en los diferentes estudios realizados en melanoma.

Autores	Tipo de muestras (n°)	Origen muestras (n°)	Prevalencia (%)	Método
Horn S <i>et al.</i> , 2013	FFPE (77)	Primarios (77)	33	NGS
Huang F <i>et al.</i> , 2013	LC (31), F (39)	Primarios (11), Mtx (28), LC (31)	71*	NGS y Sanger
Heidenreich B <i>et al.</i> , 2014	FFPE (227), F (60)	Primarios (287)	37,9	Sanger
Liau JY <i>et al.</i> , 2014	FFPE (41)	Primarios (41)	33	Sanger
Pópulo H <i>et al.</i> , 2014	FFPE (116)	Primarios (116)	22	Sanger
Griewank <i>et al.</i> , 2014	FFPE (299)	Primarios (145), mtx (154)	43 (36,6 primarios, 50,3 en mtx)	Sanger
Akbani R <i>et al.</i> , 2015	F (115)	Primarios y Mtx (115)	64,4*	Sanger
Nagore E <i>et al.</i> , 2016a	FFPE (339)	Primarios (339)	43,1	Sanger
Nagore E <i>et al.</i> , 2016b	FFPE (300)	Primarios (300)**	38,7	Sanger
Ekedahl H <i>et al.</i> , 2016	F (203)	Mtx (203)	81	Sanger
Ofner R <i>et al.</i> , 2017	FFPE (115)	Primarios (40), Mtx (75)	54,8*	Sanger
Pellegrini C <i>et al.</i> , 2017	FFPE (97)	Primarios (97)	19,6	Sanger
Hugdahl <i>et al.</i> , 2017	FFPE (266)	Primarios (194), Mtx (72)	68 (primarios)***, 64 (mtx)	Sanger
Schwaederle M <i>et al.</i> , 2018	FFPE (34)	NE	55,9	NGS
Lade-Keller J <i>et al.</i> , 2018	FFPE (185)	NE	66	Piro

FFPE: Muestra parafinada; F: Muestra en fresco; NE: No especificado; Mtx: Metástasis. NGS: Secuenciación masiva. Piro: Pirosecuenciación.

*No se especifica la prevalencia de mutaciones en función del origen (primario vs metastásico). **En este estudio se incluyen 182 muestras incluídas en estudio previo (Heidenreich *et al.*) y 118 muestras adicionales. ***Únicamente estudian melanomas del subtipo histológico MN.

Afectando a la vía MAPK, se han reportado mutaciones en los genes *MAP2K1* (*MEK1*; 15q22.31) y *MAP2K2* (*MEK2*; 19p13.3) con una prevalencia del 2-4%. Estas mutaciones conllevan una activación de la vía a través de la fosforilación de ERK, y también se han descrito como mecanismo de resistencia a las terapias dirigidas (Nikolaev *et al.*, 2011).

Como regulador negativo de la vía PI3K-AKT se ha descrito de forma reciente el gen *PREX2* (8q13.2). Es un TSG con mutaciones a lo largo de todo el gen, frecuentemente del tipo *nonsense* (sin sentido) (Berger *et al.*, 2012). A pesar de su alta frecuencia de mutaciones en los distintos estudios de secuenciación masiva (en torno al 23%), su implicación en la patogenia del melanoma aún no ha sido esclarecida (Zhang *et al.*, 2016).

Dentro del subgrupo de receptores de glutamato, recientemente se han identificado mutaciones recurrentes en los genes *GRIN2A* (16p13.2) y *GRM3* (7q21.11-q21.12). La implicación de dichos receptores en la patogenia del melanoma es desconocida por el momento, aunque se ha demostrado que existe sobreexpresión en una gran variedad de neoplasias, y que tienen un papel en la regulación de la migración y muerte celular (Stepulak *et al.*, 2014). Las mutaciones en el gen *GRIN2A* se describieron inicialmente en un 33% (Wei *et al.*, 2011), si bien estudios posteriores han identificado una prevalencia más baja (en torno a 21%) (Zhang *et al.*, 2016). Se ha descrito su posible impacto en el pronóstico al haber identificado una menor SLE y SG en melanomas portadores de estas mutaciones (D'mello *et al.*, 2014). En cuanto a *GRM3*, las mutaciones se han descrito en un 16,3% de los melanomas. Estudios funcionales en cuatro de las variantes identificadas en este gen han demostrado que se asocian a activación de *MEK1/MEK2* (Prickett *et al.*, 2011).

Paralelamente, se han identificado mutaciones en los genes *RAC1* (7p22.1), *PPP6C* (9q33.3), y *STK19* (6p21.33) (Hodis *et al.*, 2012). Es de particular interés el gen *RAC1*, en el que se ha descrito

Introducción

una mutación recurrente (P29S) en aproximadamente el 6% de los melanomas. Esta mutación aparece con mayor frecuencia en áreas fotoexpuestas (Krauthammer *et al.*, 2012), y en melanomas con características de mayor agresividad, como mayor espesor tumoral, mayor índice mitótico, ulcerados, del subtipo histológico nodular, y con afectación ganglionar al diagnóstico (Mar *et al.*, 2014). Estudios funcionales han demostrado que la mutación P29S confiere resistencia intrínseca a los inhibidores de BRAF (Watson *et al.*, 2014), y también suprime la respuesta inmune antitumoral al incrementar la expresión de PD-L1 (Vu *et al.*, 2015). Asimismo, se han descrito mutaciones en el gen *PPP6C* (la más frecuente es la R264C), con una prevalencia aproximada del 9%. Actúa como un TSG que regula el ciclo celular y la mitosis. En el gen *STK19* se han identificado mutaciones en el 4% de los melanomas (D89N y P90L), y codifica una quinasa con función desconocida por el momento (Hodis *et al.*, 2012).

Recientemente también se han reportado las mutaciones en el gen *IDH1* (2q34) (Hodis *et al.*, 2012). Este gen codifica la enzima isocitrato dehidrogenasa 1, y cataboliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en alfa-ketoglutarato (α -KG) durante el ciclo de Krebs (Yan *et al.*, 2009). Estudios iniciales mediante secuenciación de Sanger identificaron bajas tasas de prevalencia (Tabla 7) (López *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2011); sin embargo estudios más recientes mediante secuenciación masiva han descrito una prevalencia mayor, con mutaciones recurrentes localizadas en el *hotspot* R132 (Hodis *et al.*, 2012; Krauthammer *et al.*, 2015; Akbani *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las mutaciones en el gen *IDH1* se asocian a un fenotipo hipermetilador (Noushmehr *et al.*, 2010;

Akbani *et al.*, 2015), sin embargo no se ha descrito su asociación a las características clinicopatológicas ni al pronóstico de los pacientes con melanoma.

De forma adicional, un meta análisis reciente con datos de estudios de secuenciación masiva ha identificado 12 genes significativamente mutados en melanomas “pan-negativos” (sin mutaciones en los genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *GNAQ* y *GNA11*) que incluyen *ALK*, *STK31*, *DGKI*, *RAC1*, *EPHA4*, *ADAMTS18*, *EPHA7*, *ERBB4*, *TAFIL*, *NF1*, *SYK* y *KDR*, de los cuales los genes *RAC1*, *ADAMTS18*, *EPHA7*, *TAFIL* y *NF1*, han resultado portadores de mutaciones recurrentes (Xia *et al.*, 2014).

Por otro lado, estudios recientes han identificado mutaciones recurrentes en el gen *SF3B1* afectando al codón R625 en melanomas mucosos (Hayward *et al.*, 2017; Hintzsche *et al.*, 2017).

Introducción

Tabla 7: Prevalencia de mutaciones en el gen *IDH1* (codón R132) descritas en los diferentes estudios realizados en melanoma.

Autores	Tipo de muestras (n°)	Origen muestras (n°)	Prevalencia (%)	Método
López GY <i>et al</i> , 2010	LC (78), F (9)	Mtx (87)	1,1 (1,3% LC, 0 F)	Sanger
Shibata T <i>et al</i> , 2011	FFPE (39)	Primarios (22), mtx (17)	5,1 (0 primarios, 5,1 % mtx)	Sanger
Hodis E <i>et al</i> , 2012	LC (76), F (45)	Primarios (15), mtx (116)	1,6 (no especificado)	NGS
Krauthammer M <i>et al</i> , 2015	LC y F (230)	Primarios, mtx (no especificado)	2,3 (no especificado)	NGS
Akbani R <i>et al</i> , 2015	F (320)	Primarios (58), mtx (262)	6,1* (5,2% primarios, 4,2% mtx)	NGS
Lee J <i>et al</i> , 2015	FFPE (38)	Primarios (13), mtx (25)	13** (7,7% primarios, 16% mtx)	NGS

FFPE: Muestra parafinada; F: Muestra en fresco; LC: Líneas celulares; Mtx: Metástasis; NGS: *Next-Generation Sequencing*.

*Incluidas únicamente las mutaciones identificadas en el codón R132, y excluidas las detectadas en otras regiones (P33S, G8S, E174_splice). **No quedan especificadas que sean mutaciones en el codón R132.

4.1.4. Clasificación genómica del melanoma

Los avances en la biología molecular del melanoma están permitiendo establecer nuevas clasificaciones del melanoma basadas en las alteraciones moleculares, que podrían sustituir a la clásica clasificación clínico-patológica (Clark *et al.*, 1986).

En este sentido, una de las aportaciones más importantes ha sido la del grupo de Bastian *et al*, que demostraron la existencia de distintas vías moleculares en las diferentes regiones anatómicas, derivado de los patrones de exposición a la radiación UV (Curtin *et*

al., 2005). Así, estos autores describieron que los melanomas en áreas de exposición solar crónica, los acrales y los mucosos con frecuencia son portadores de mutaciones en el gen *KIT*, mientras que los melanomas en áreas de exposición solar intermitente presentan en un 81% de los casos mutaciones en los genes *BRAF* o *NRAS* (Curtin *et al.*, 2006). Estudios posteriores han corroborado la existencia de una firma genética inducida por la exposición solar, con múltiples transiciones C>T o CC>TT (Zhang *et al.*, 2016).

De forma adicional, el grupo de la TCGA ha propuesto recientemente una nueva clasificación genómica del melanoma en la que se distinguen cuatro subtipos en base a sus alteraciones genéticas: el subtipo portador de mutaciones en el gen *BRAF* (52%); el subtipo con mutaciones en los genes de la familia RAS (28%); el subtipo portador de mutaciones en el gen *NFI* (14%); y el subtipo triple-*wt* (6%), en el que no se identifican alteraciones en ninguno de los genes anteriores (Akbari *et al.*, 2015). Este último grupo se caracteriza por una menor proporción de melanomas con la firma genética inducida por la exposición solar, y un mayor porcentaje de otras alteraciones moleculares (variación en el número de copias o genes de fusión).

Cabe destacar que a diferencia de la clasificación tradicional, esta nueva clasificación molecular podría tener implicaciones en el manejo de los pacientes, que estaría basado en la administración de terapias dirigidas en función de las diferentes alteraciones moleculares identificadas.

4.2. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS

La epigenética hace referencia a los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica sin acompañarse de alteraciones en la secuencia de ADN. El principal mecanismo epigenético implicado en cáncer es la metilación del ADN, aunque también tienen un papel importante la modificación de histonas mediante acetilación o metilación, y la expresión de ARN no codificante (ARNnc) donde se incluyen los microRNAs y los ARN no codificantes de cadena larga, entre otros (Figura 7). Una diferencia importante con las alteraciones genéticas es que las aberraciones epigenéticas son potencialmente reversibles, hecho que podría tener implicaciones en el tratamiento de los pacientes (Lee *et al.*, 2014). Los siguientes apartados se centran en la metilación del ADN y la expresión de microRNAs en el melanoma ya que son los dos tipos de alteraciones epigenéticas que serán abordadas en el presente trabajo.

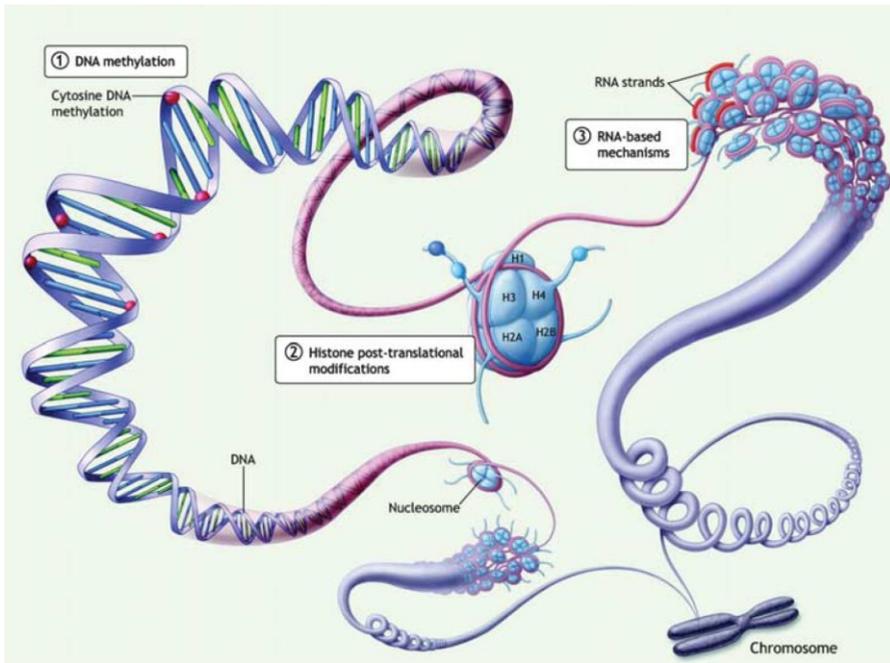


Figura 7: Principales mecanismos epigenéticos: 1: Metilación del ADN; 2: Modificación de histonas; 3: Expresión de ARNnc. Tomada de Lee *et al.*

4.2.1. Metilación en el promotor de genes supresores tumorales en el melanoma

La metilación del ADN representa la unión covalente de un grupo metilo (-CH₃) a una citosina en las denominadas islas CpG (regiones de ADN con alta frecuencia de dinucleótidos de citosina y guanósina), que están presentes en el 40% de los promotores de los genes (Lee *et al.*, 2014). Las enzimas encargadas de la metilación del ADN son las ADN-metiltransferasas (DNMTs), siendo las más conocidas la DNMT1, DNMT3a, y DNMT3b. Esta modificación del

Introducción

ADN conlleva un silenciamiento de la expresión génica al impedir la unión de los factores de transcripción, y favorecer la unión de los complejos represores (Figura 8).

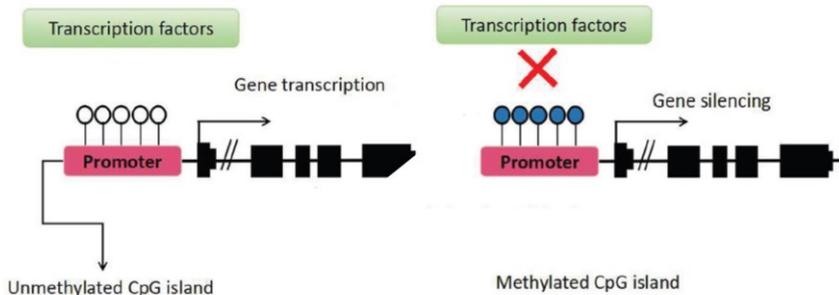


Figura 8: Mecanismo de regulación de la expresión génica de la metilación del ADN. Modificada de Fu et al (Fu *et al.*, 2017).

Se ha descrito que la metilación en el promotor de TSGs está implicada en el desarrollo y progresión de múltiples neoplasias malignas. Concretamente en el melanoma, se ha reportado metilación aberrante en más de 100 genes implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, señalización celular, transcripción y apoptosis (Schinke *et al.*, 2010; Micevic *et al.*, 2017). Son numerosos los estudios realizados al respecto, sin embargo muestran una gran heterogeneidad en lo que se refiere a genes analizados y tipo de muestras implicadas en el estudio.

Los principales TSGs en los que se ha identificado metilación aberrante en el melanoma con prevalencias variables son *PTEN* (6-62%), *RASSF1* (15-57%), *RARB2* (20-70%) *MGMT* (10-35%), y

CDKN2A (5-27%) (Gonzalzo *et al.*, 1997; Hoon *et al.*, 2004; Furuta *et al.*, 2004; Tanemura *et al.*, 2009)

Asimismo, diversos autores han descrito la asociación de perfiles de metilación con las características clínico-patológicas de los melanomas: los melanomas de localización acral se asocian preferentemente con la metilación en los genes *MGMT* y *TERT* (De Araújo *et al.*, 2015); también se ha reportado la asociación entre la metilación del gen *RARB* y los melanomas con mayor índice de Breslow (Hoon *et al.*, 2004); así como la asociación entre un fenotipo hipermetilador y melanomas con alto índice de Breslow y ulceración (Thomas *et al.*, 2014).

El papel de la metilación como biomarcador útil al diagnóstico también ha sido propuesto por otros autores al haberse descrito su utilidad en el diagnóstico diferencial entre nevus y melanoma. Conway *et al.* estudiaron 27 nevus melanocíticos y 22 melanomas invasivos con una plataforma de alto rendimiento, e identificaron 26 islas CpG en 22 genes con niveles diferenciales de metilación entre ambos grupos de estudio (Conway *et al.*, 2011). Asimismo, otro estudio ha descrito la ausencia de metilación en 24 TSGs en una serie de 12 nevus de Spitz y 16 tumores spitzoides atípicos comparados con 24 melanomas (Takata *et al.*, 2007).

Adicionalmente, varios autores han sugerido el valor de la metilación como biomarcador pronóstico. Sigalotti *et al.* describieron la asociación de un fenotipo hipermetilador en una firma de 17 genes, con una menor SLE y SG (Sigalotti *et al.*, 2012). A su vez se ha

Introducción

demostrado la relevancia de la metilación en el promotor del gen *PTEN*, que ha sido descrita como un factor pronóstico independiente en dos estudios recientes (Lahtz *et al.*, 2010; Roh *et al.*, 2016). También se ha identificado la asociación de la metilación en el gen *RASSF1* con melanomas en estadio tumoral avanzado (afectación locorregional y/o metastásica) (Tanemura *et al.*, 2009). Otros genes que han demostrado impacto en la supervivencia son *RARb*, *ESR1*, *MGMT*, y *HOXD9* (Mori *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2006; Marzese *et al.*, 2014; Guadagni *et al.*, 2017).

Finalmente, cabe destacar el papel de la metilación en la predicción de respuesta a los tratamientos; tal como la metilación aberrante de los genes *MGMT* y *RASSF1* que han demostrado su utilidad en la predicción de respuesta a la quimioterapia (Mori *et al.*, 2005; Tuominen *et al.*, 2015).

4.2.2. Expresión de microRNAs en el melanoma

Los miRNAs son moléculas de ARN monocatenario no codificante y de pequeño tamaño (22 nucleótidos), capaces de regular la expresión génica a nivel postranscripcional (Angulo *et al.*, 2012). El miRNA es capaz de reconocer el ARN mensajero (ARNm) diana mediante la unión entre las regiones complementarias de ambas moléculas, de manera que se une en el extremo 3' de la región no codificante del ARNm y según el grado de complementariedad pone en marcha uno de los mecanismos de represión: degradación del ARNm si la complementariedad es perfecta, o inhibición de la traducción cuando la complementariedad es menor (Figura 9).

Mediante este mecanismo, los miRNAs participan en la regulación de numerosos procesos celulares fisiológicos, siendo relevante el hecho de que un determinado ARNm puede ser diana de un gran número de miRNAs, al igual que cada miRNA puede regular la expresión génica de múltiples genes. A su vez, la expresión de los miRNAs se encuentra influenciada por diferentes mecanismos, como la regulación de la transcripción, regulación epigenética, anormalidades cromosómicas, o alteraciones en la maquinaria de síntesis de los miRNAs (Iorio *et al.*, 2010).

Introducción

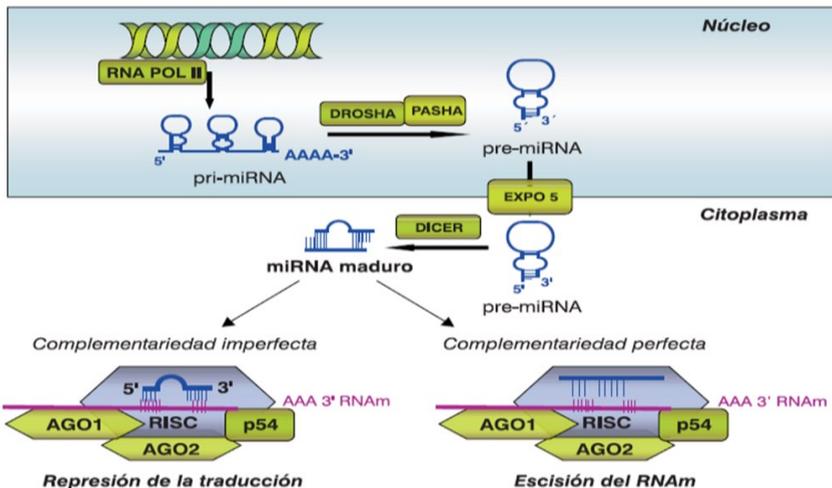


Figura 9: Biogénesis de los miRNAs y mecanismo de regulación de la expresión génica postranscripcional mediante la complementariedad con el ARNm. Tomada de Angulo *et al.*

Existe evidencia acumulada de la implicación de los miRNAs en la patogenia de múltiples enfermedades, entre las que destaca su papel en el desarrollo de diversos tipos de cáncer. En los últimos años, se han identificado más de 800 miRNAs que se encuentran sobreexpresados o infraexpresados en el melanoma, dependiendo de si regulan oncogenes o TSGs (Völler *et al.*, 2013). De hecho, son múltiples los grupos de investigación que han demostrado la implicación de diversos miRNAs en la melanogénesis, a través de la regulación de la proliferación y diferenciación celular, la migración e invasión, la apoptosis o la regulación de la respuesta inmune (Bonazi *et al.*, 2012; Glud *et al.*, 2013; Mione *al.*, 2015; Latchana *al.*, 2016a) (Tabla 8).

Tabla 8: Principales miRNAs implicados en la patogénesis del melanoma.

Función	microRNA	Expresión	Gen diana
Proliferación			
	let-7b	Baja	<i>CDK4, cyclin D1, D3</i>
	miR-21	Alta	<i>PTEN, BCL-2</i>
	miR-9	Baja	<i>NFKB1</i>
	miR-193b	Baja	<i>Cyclin D1</i>
	miR-145	Baja	<i>c-MYC</i>
	miR-221/22	Alta	<i>KIT, p27,</i>
	miR-203	Baja	<i>E2F3, ZBP-89,</i>
	miR-205	Baja	<i>E2F1</i>
	miR-206	Baja	<i>CDK4, cyclin D1, C</i>
	miR-328	Baja	<i>TGFB2</i>
	miR-125b	Baja	<i>c-JUN</i>
	miR-155	Baja	<i>SKI</i>
	miR-34a/c	Baja	<i>c-MET</i>
	miR-15b	Alta	<i>BIM1</i>
	miR-126	Baja	<i>ADAM9, MMP7</i>
	miR-18b	Baja	<i>MDM2, HIF-1α</i>
	miR-149-5p	Baja	<i>LRIG2</i>
	miR-605	Baja	<i>INPP4B</i>
	miR-138	Baja	<i>HIF-1α</i>
	miR-493	Baja	<i>IRS4</i>
	miR-455	Baja	<i>IGF-1R</i>
	miR-199a-5p	Baja	<i>HIF-1α</i>
	miR-767	Alta	<i>CYLD</i>
Invasión			
	let-7a	Baja	<i>ITGB3</i>
	miR-30b/d	Alta	<i>GALNT7, GALNT1, GNAI2, SEMA3A</i>
	miR-21	Alta	<i>TIMP3</i>
	miR-34a/b/c	Baja	<i>ULBP2, CDK6, c-MET</i>
	miR-211	Baja	<i>BRN2, KCNMA1, NUA1, IGF2R, TGFB2, NFAT5, RAB22A</i>
	miR-214	Alta	<i>TFAP2C</i>
	miR-9	Baja	<i>NF-κB1</i>
	miR-200a/c	Baja	<i>MARCKS, CDK6</i>
	miR-145	Baja	<i>FSCN1</i>
	miR-182	Alta	<i>FOXO3, MITF</i>
	miR-196a	Baja	<i>HOX-C8, HOX-B7, BMP4</i>
	miR-137	Alta	<i>MET, MITF, YB1, EZH2</i>
	miR-26a	Baja	<i>MITF</i>
	miR-203	Baja	<i>SLUG</i>
	miR-153-3p	Baja	<i>SNAI1</i>
	miR-339-3p	Baja	<i>MCL1</i>
	miR-542-3p	Baja	<i>PIM1</i>
	miR-17	Alta	<i>ETV1</i>
	miR-33a	Baja	<i>HIF-1α</i>
	miR-23a	Baja	<i>ATG12</i>
Apoptosis			
	miR-15b	Alta	<i>BIM1, BCL-2</i>
	miR-155	Baja	<i>SKI</i>
	miR-26a	Baja	<i>SODD</i>
	miR-21	Alta	<i>PTEN, BCL-2</i>
	miR-425	Baja	<i>IGF-1</i>
	miR-205	Baja	<i>E2F1, E2F15</i>
Respuesta inmune			
	miR30b/d	Alta	<i>GALNT7</i>
	miR34a/c	Baja	<i>ULBP2</i>
	miR-210	Alta	<i>PTPN1, HOXA1, TP53111</i>

Introducción

A pesar de la amplia descripción de miRNAs implicados en la patogenia del melanoma, sólo un escaso número de estudios han analizado la asociación de los miRNAs con las características clínico-patológicas. En este sentido, cabe destacar un estudio en el que identifican un perfil de siete miRNAs (let-7g, miR-15a, miR-16, miR-138, miR-181a, miR-191, y miR-933) con menor expresión en melanomas del subtipo histológico MES comparados con MN (Poliseno et al., 2012). Por otro lado, se ha señalado que los melanomas con alto índice de Breslow y estadios avanzados podrían correlacionarse con la expresión de miR-30b/-30d y miR-106 (Gaziel-Sovran et al., 2011; Lin et al., 2015). También se ha demostrado mayor expresión de miR-21-5p en melanomas con mayor espesor tumoral, ulcerados, con presencia de mitosis e invasión linfovascular (Babapoor et al., 2017). Asimismo, se ha identificado mayor expresión de let-7b, miR-92a, y miR-193b en melanomas porcinos con presencia de regresión histológica (Baco et al., 2014).

Con respecto a los miRNAs descritos en el melanoma, destacan de forma particular miR-21, miR-125b, miR-150, miR-155, y miR-205, por su utilidad en el diagnóstico diferencial entre nevus y melanoma (Latchana *et al.*, 2016a). La sobreexpresión de miR-21 se ha asociado a la invasión y migración celular mediante su regulación negativa de los genes *TIMP3* y *PTEN* (Yang *et al.*, 2011; Martin del Campo *et al.*, 2015). Asimismo, diversos estudios han descrito la utilidad de este oncomiR en el diagnóstico diferencial entre nevus y melanoma, dada la mayor expresión en melanomas comparados con nevus melanocíticos (Grignol *et al.*, 2011; Satzger *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012; Wandler *et al.*, 2017). También se la sugerido el posible

papel diagnóstico de miR-125b, al haberse demostrado su infraexpresión en el melanoma comparado con el tejido sano, y con menor expresión también en lesiones precursoras con atipia celular (Holst *et al.*, 2011). A su vez, se ha descrito su implicación en la regulación de la proliferación celular a través de su gen diana, el factor de transcripción c-JUN (Zhang *et al.*, 2014).

Adicionalmente, se ha propuesto el papel de los miRNAs como biomarcadores pronósticos, especialmente miR-137, miR-203, miR-206 y miR-10b, cuyos niveles se han asociado menores tasas de supervivencia en los pacientes con melanoma (Tian *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2017). También se ha sugerido el posible papel de los miRNAs como mecanismos de respuesta a las actuales terapias dirigidas, como es el caso de miR-514a, que modula la sensibilidad a los inhibidores de BRAF a través de la regulación del gen *NF1* (Stark *et al.*, 2015); el miR-579-3p, que regula la expresión de *BRAF* y *MDM2* y cuya expresión está disminuida en las células resistentes a tratamiento (Fattore *et al.*, 2016); o la sobreexpresión de miR-204-5p y miR-211-5p que recientemente se han asociado a la resistencia al tratamiento con vemurafenib (Díaz-Martínez *et al.*, 2017).

5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS EN EL ABORDAJE MOLECULAR DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL MELANOMA

5.1. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONALES

Secuenciación de Sanger

Secuenciar una molécula de ADN consiste en determinar en qué orden se disponen los cuatro nucleótidos (A, T, C y G) que componen la molécula. Aunque el primer método diseñado para secuenciar el ADN fue un método químico desarrollado por Allan Maxam y Walter Gilbert en 1977 (Maxam et al., 1977), es el método enzimático descrito por Frederick Sanger (Sanger *et al.*, 1977) el más ampliamente extendido y el que utilizamos en la actualidad.

El método de secuenciación de Sanger se conoce como método didesoxi o secuenciación por terminación de la cadena. Es un método enzimático basado en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple (que se utiliza como molde), en presencia de ADN polimerasa, un cebador o *primer* para iniciar la síntesis de ADN (secuencia corta de nucleótidos que se une por complementariedad de bases al ADN molde), los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP y dTTP) que componen la secuencia del ADN y cuatro

didesoxirribonucleótidos trifosfato terminadores (ddNTPs: ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP).

Introduciendo ligeras variaciones en el método original de Sanger se ha conseguido automatizar el proceso, tales como han sido el uso de ddNTP terminadores marcados fluorescentemente (obtención de los electroferogramas), la sustitución de la ADN polimerasa por la Taq-polimerasa, y la utilización de la electroforesis capilar en lugar de la electroforesis en gel para la separación de los fragmentos.

En un termociclador se lleva a cabo la reacción de polimerización incorporándose aleatoriamente los cuatro tipos de dNTPs, así como ddNTPs marcados con fluoróforo. Los ddNTPs carecen del grupo hidroxilo (grupo 3'-OH), que permite la adición del nucleótido consecutivo, por lo que funcionan como terminadores de la síntesis de la cadena de ADN. La ADN polimerasa va añadiendo dNTPs hasta que de forma aleatoria, incorpora un ddNTP que interrumpe la síntesis de la hebra, generándose múltiples fragmentos de ADN de distintos tamaños. La electroforesis capilar es una técnica que permite separar fragmentos de ADN cuya longitud difiere en un sólo nucleótido. Los fragmentos de distintos tamaños llegan al final del capilar, donde son excitados con un láser y se detecta la fluorescencia emitida por el ddNTP terminal. El color de esta fluorescencia determina de qué nucleótido se trata. El gráfico resultante se denomina electroferograma, en el que se observan picos de diversos colores. Cada color indica qué nucleótido ocupa cada

Introducción

posición en la molécula de ADN o, lo que es lo mismo, su secuencia (Figura 10).

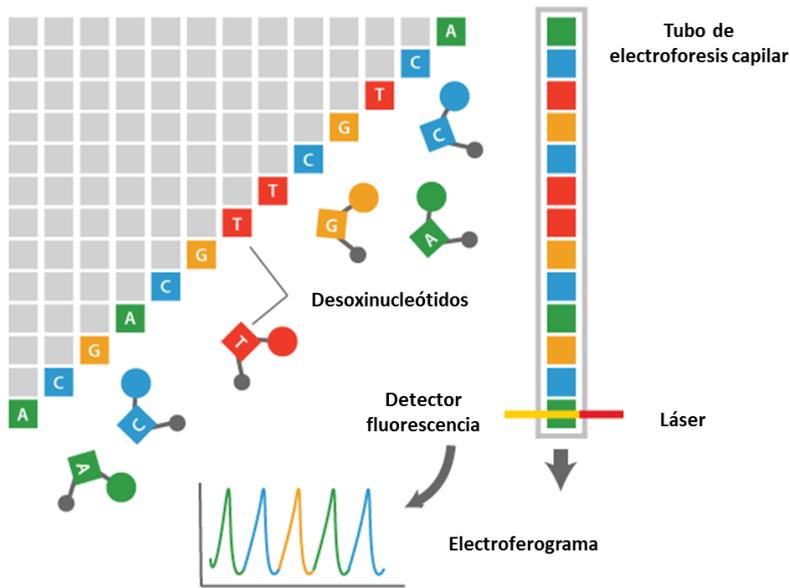


Figura 10: Representación del método de Sanger automatizado.

Aunque la secuenciación directa o método de Sanger continúa siendo el método de referencia o “*gold standard*” en la confirmación de alteraciones o cambios en la secuencia nativa del ADN, presenta una serie de desventajas como son la baja sensibilidad analítica o bajo límite de detección (LoD; *limit of detection*) de la técnica (en torno a un 20%); riesgo elevado de contaminación por el manejo de productos post-PCR; alto requerimiento de tiempo al ser necesarios múltiples pasos para llevarlo a cabo; y amplia experiencia por el usuario en la interpretación de los electroferogramas (Tabla 9).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida, económica y ampliamente utilizada que sirve para amplificar un fragmento de ADN. Para ello, requiere de la ADN polimerasa, ADN molde y una pareja de cebadores diseñados específicamente para la región de ADN de interés. La reacción consiste en la desnaturalización de la molécula de ADN en dos cadenas sencillas, la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias en cada uno de los extremos del ADN molde y la extensión mediante la ADN polimerasa (Figura 11A). Este proceso se repite en 25-35 ciclos, empleando los nuevos fragmentos de ADN que se generan como ADN molde, de manera que en cada ciclo se duplica el número de moléculas de ADN (Figura 11B).

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional en la que es posible monitorizar en tiempo real o controlar el progreso de la reacción conforme se produce. Por tanto, permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación mediante la adición de un fluoróforo que será detectado en un termociclador provisto de sensores de fluorescencia.

Introducción

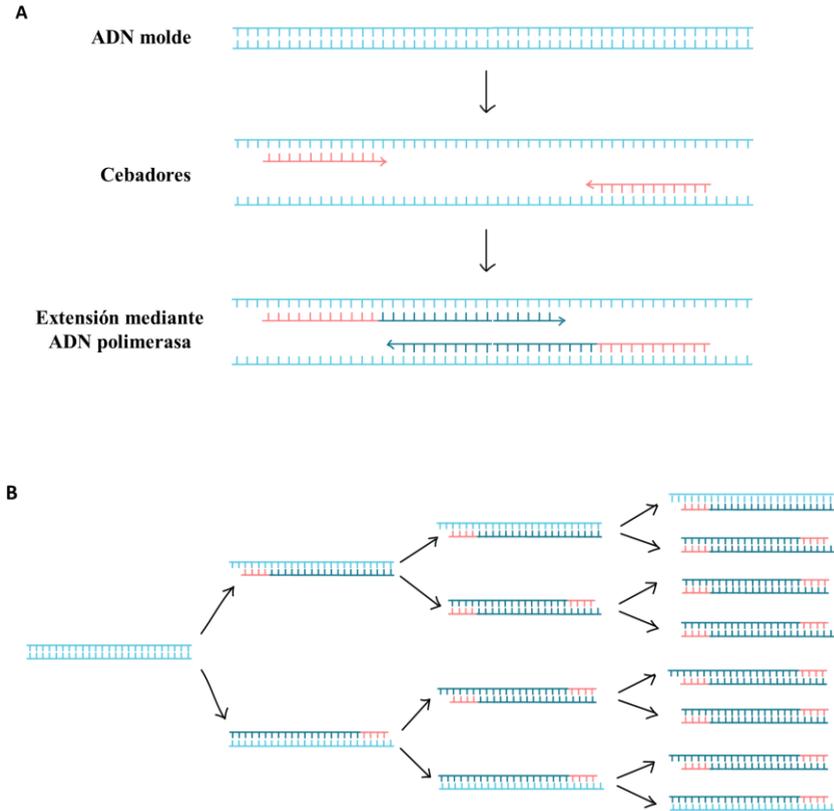


Figura 11: Representación de la amplificación mediante PCR.

Es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para estudios de expresión de génica así como para el análisis de mutaciones. En este sentido, diferentes aproximaciones de PCR en tiempo real han sido desarrolladas con objeto de identificar mutaciones puntuales en el melanoma. Uno de ellos es la amplificación mediante PCR alelo-específica, que es un método altamente selectivo y con elevada sensibilidad analítica o LoD (en torno al 5%). Se basa en una amplificación por PCR en tiempo real en la que se emplean cebadores alelo-específicos que amplifican una determinada región de ADN con una mutación conocida (Halait *et al.*,

2012). El primer test molecular validado en un ensayo clínico para la determinación de la mutación p.Val600Glu en pacientes con melanoma metastásico (Chapman et al., 2011) ha sido *Cobas® 4800 BRAF V600 test*. Otras plataformas han sido posteriormente desarrolladas mejorando la sensibilidad y automatización (sistema *Idylla™*).

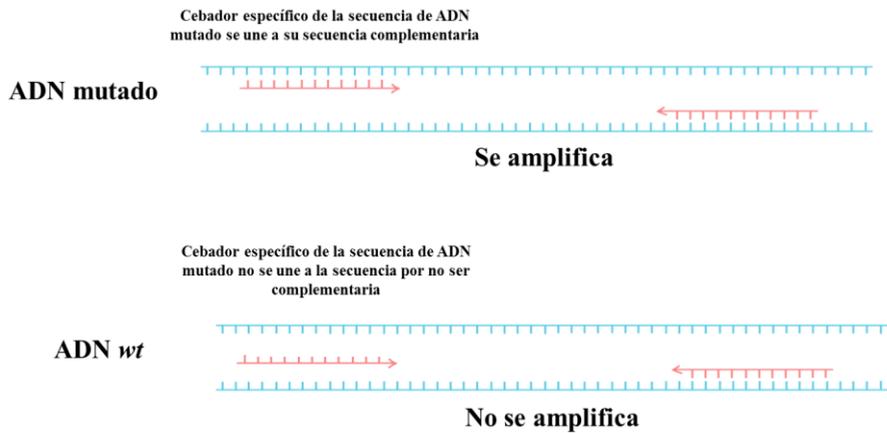


Figura 12: Representación de la detección de mutaciones mediante PCR alelo-específica. El cebador únicamente se une a la secuencia de ADN portadora de la mutación.

Introducción

Otra aproximación de PCR en tiempo real descrita para el estudio de las alteraciones moleculares del melanoma es el análisis de curvas de fusión de alta resolución (*High resolution melting*; HRM). Esta metodología posee una elevada sensibilidad analítica (1-6%), y ha sido empleado en melanoma y otros tumores como método de cribado de variaciones genéticas (De Juan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014). Se basa en la realización de una amplificación mediante PCR en tiempo real seguido de un gradiente de temperaturas que produce la desnaturalización y renaturalización de los fragmentos de ADN generados. Todo ello se realiza en presencia de un intercalante de nueva generación y saturante, que se une completamente al ADN de doble cadena (Figura 13A).

Al hacerlo emite una fluorescencia que va disminuyendo al incrementar la temperatura a un gradiente determinado, lo cual crea un patrón de disociación o curva de fusión (Arthofer *et al.*, 2011). Las variaciones en las secuencias son detectadas tanto por un cambio en la temperatura de fusión (temperatura de *melting* o T_m) como por un cambio en la forma de la curva de disociación (Figura 13B). Todo ello es posible no solo debido al uso de fluorocromos de unión a la doble cadena de ADN de tercera generación, sino también al desarrollo de instrumentos de PCR a tiempo real con un sistema de control de temperatura preciso y una capacidad de captura de datos avanzada. Los datos son analizados y manipulados con programas diseñados específicamente para el análisis de HRM.

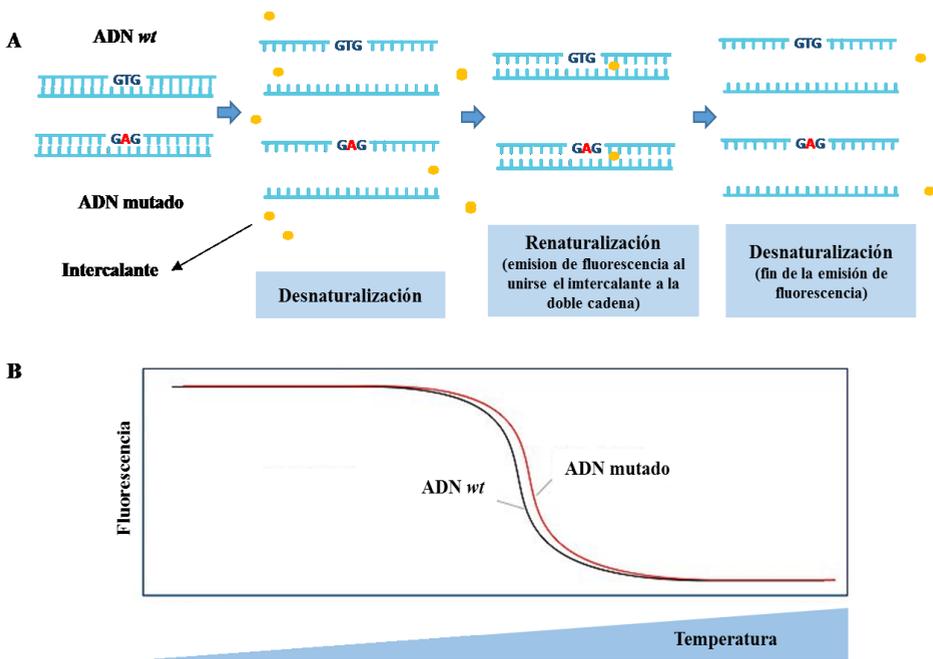


Figura 13: Representación esquemática del método HRM. El gradiente de temperaturas produce la desnaturalización y renaturalización de los fragmentos de ADN en presencia del intercalante que se une completamente a la doble cadena (A). Las diferencias en la curva de fusión son debidas a las variaciones en la temperatura de *melting* dada la diferente composición de nucleótidos (A).

Introducción

Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es otro método enzimático que permite determinar la secuencia de una molécula de ADN. Se trata de un método de síntesis, porque la secuencia del ADN molde se determina a medida que se sintetiza su hebra complementaria. Para determinar la base que se añade durante la síntesis se lleva a cabo una serie de reacciones en las que participan cuatro enzimas (ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa) y, los sustratos adenosina 5'-fosfosulfato (APS) y luciferina. En este caso, en cada ciclo solo se añade uno de los cuatro dNTPs y si resulta ser el complementario a la hebra molde, se incorporará a la nueva cadena de ADN y se producirá una molécula de pirofosfato (PPi) por cada dNTPs incorporado (ya que puede haber varias bases iguales seguidas en la secuencia del molde). Si no es el complementario al molde, se añade otro dNTPs y así sucesivamente. Cada vez que la ADN polimerasa incorpora un nuevo dNTP, se libera un PPi que genera una señal luminosa gracias a una reacción quimioluminiscente por la acción de las enzimas ATP sulfurilasa y luciferasa (Figura 14).

En general, la pirosecuenciación es una técnica con elevada sensibilidad analítica (en torno al 2%) y que se ha empleado en el estudio de mutaciones de melanoma (Edlundh-Rose *et al.*, 2006). De hecho, se han desarrollado kits comerciales que permiten la identificación de las mutaciones en los codones más frecuentes en el gen *BRAF* (*Therascreen® BRAF Pyro Kit*).

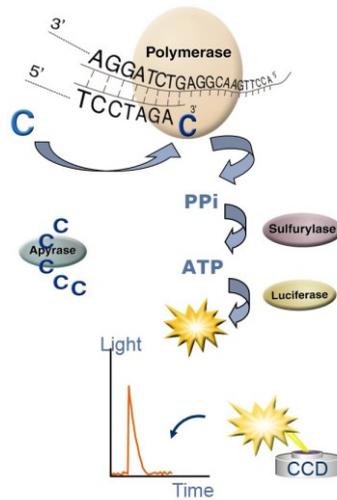


Figura 14: Representación del método de detección de mutaciones mediante pirosecuenciación.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) constituye una herramienta fundamental en el diagnóstico histopatológico de rutina. Se basa en la utilización de anticuerpos que se unen de forma específica a determinados antígenos presentes en las células. Dichos anticuerpos son detectados gracias a que se encuentran marcados con cromóforos, que pueden unirse directamente al anticuerpo primario, o indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A.

Existen anticuerpos disponibles para una amplia variedad de antígenos que son empleados en la práctica clínica asistencial para el diagnóstico y clasificación de numerosas neoplasias. Adicionalmente, en los últimos también se ha destacado la utilidad de la IHQ para la detección de mutaciones. Así, en el melanoma se ha descrito el

Introducción

empleo de anticuerpos específicos para la detección de la principal mutación en el gen *BRAF* (p.Val600Glu) (Riveiro-Falkenbach *et al.*, 2017), así como en el gen *NRAS* (p.Gln61Arg) (Dias-Santagata *et al.*, 2016).

La IHQ tiene la ventaja de que es una técnica rápida, barata, y que muestra una elevada sensibilidad analítica (en torno al 5%) y especificidad (98%), comparable a las otras técnicas empleadas en el diagnóstico molecular (Ihle *et al.*, 2014). Sin embargo, tiene el inconveniente de que únicamente detecta mutaciones específicas (Ugen *et al.*, 2015).

Tabla 9: Principales métodos empleados para el estudio de mutaciones en el melanoma. Modificada de Riveiro-Falkenbach *et al.* (Riveiro-Falkenbach *et al.*, 2017).

Método	Descripción	LOD	Limitaciones
Secuenciación Sanger	Amplificación por PCR convencional y secuenciación mediante incorporación aleatoria de ddNTPs terminadores.	20%	Alto requerimiento de tiempo, baja sensibilidad
PCR alelo-específica	Amplificación por PCR en tiempo real mediante cebadores específicos para cada mutación	1-10%	Limitada al estudio de determinadas mutaciones
High resolution melting	Amplificación por PCR en tiempo real y posterior comparación de las temperatura de fusión	1-6,6%	No permite identificar cambios de nucleótidos específicos
Pirosecuenciación	Amplificación por PCR convencional seguido de secuenciación mediante la detección de pirofosfatos	2-5%	Elevado coste, se requiere la plataforma
Inmunohistoquímica	Empleo de anticuerpos específicos para la proteína	5%	Limitada al estudio de una única mutación
Secuenciación masiva	Amplificación por PCR multiplex y secuenciación (ddNTPs terminadores, detección de pirofosfatos, cambios pH)	1%	Personal cualificado, complejo análisis de datos

5.2. SECUENCIACIÓN MASIVA O NEXT-GENERATION SEQUENCING

5.2.1. Metodología de la secuenciación masiva

Los avances tecnológicos en la última década nos han permitido pasar de la secuenciación automática de un máximo de 96 secuencias de 800 nucleótidos con secuenciadores de primera generación (método de Sanger) a la secuenciación de millones de fragmentos de ADN en paralelo con equipos de segunda generación (*Next-Generation Sequencing*; NGS), e inclusive a las nuevas estrategias de secuenciación de tercera generación que utilizan tecnología SMRT (*single molecule real time sequencing*).

Las plataformas de NGS difieren en la tecnología utilizada, pero todas ellas comparten la capacidad de secuenciar fragmentos de ADN amplificados clonalmente siguiendo un esquema de trabajo común (Figura 15). En un primer paso se requiere la fragmentación del ADN y ligación de los adaptadores (“etiquetas o *barcodes*”, que son secuencias cortas de ADN específicas de cada muestra que se añaden a los extremos de cada fragmento de ADN), seguido de la amplificación que se realiza sobre ADN inmovilizado en una superficie sólida (nanopartícula esférica o *bead*), que se deposita en el fondo de nanopocillos de una placa (chip o *flowcell*) en los que se lleva a cabo la reacción de secuenciación. Esta aproximación permite la lectura simultánea de millones de secuencias; en consecuencia, ofrece como ventajas ser una tecnología más sensible, rápida y de menor coste (al disminuir la cantidad de reactivos necesarios en estas

Introducción

nanoreacciones); sin embargo, su principal limitación es el elevado volumen de datos que genera, requiriendo no sólo una infraestructura adecuada para su almacenaje, sino también un correcto análisis e interpretación de los mismos. Este hecho, ha determinado el desarrollo de técnicas bioinformáticas avanzadas que permiten el análisis de los datos generados mediante la consulta de bases de datos y la aplicación de diversas herramientas computacionales (Gogol-Döring et al., 2012; Grada et al., 2013).

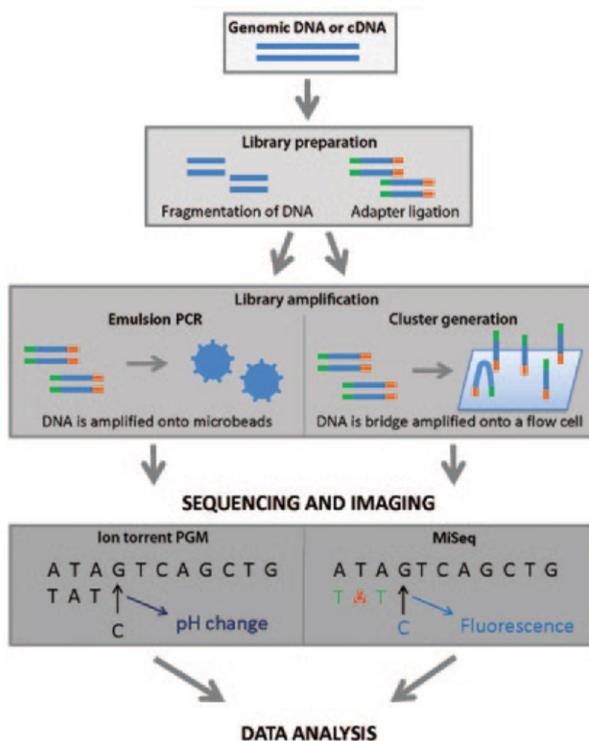


Figura 15: Flujo de trabajo utilizado en los estudios de secuenciación masiva. Tomada de Grada *et al.* (Grada *et al.*, 2013).

Una de las principales diferencias entre las plataformas de NGS es el tipo de amplificación utilizada, que puede ser mediante

PCR en emulsión o PCR puente (Figuras 16A y 16B). En la PCR en emulsión la reacción se lleva a cabo en una emulsión aceite-agua que genera microgotas para encapsular las microesferas cubiertas de cebadores (oligonucleótidos complementarios a los adaptadores) y los fragmentos de ADN. A cada microesfera se une un único fragmento de ADN mediante la secuencia del cebador que debe ser complementaria a la del adaptador del ADN y se lleva a cabo la amplificación, de forma que finalmente cada microesfera queda recubierta por miles de copias de la misma secuencia de ADN (este mecanismo es propio de Ion Torrent). En la PCR puente, la reacción tiene lugar en una placa de vidrio, sobre la que están dispuestos adaptadores complementarios a los adaptadores anclados en los fragmentos de ADN, que actúan como cebadores. Así, cada fragmento de ADN se une por sus extremos a los adaptadores complementarios y se lleva a cabo la amplificación clonal. Este proceso se repite múltiples veces, de manera que finalmente se agrupan secuencias idénticas formando *clusters* (este mecanismo es propio de Illumina).

Introducción

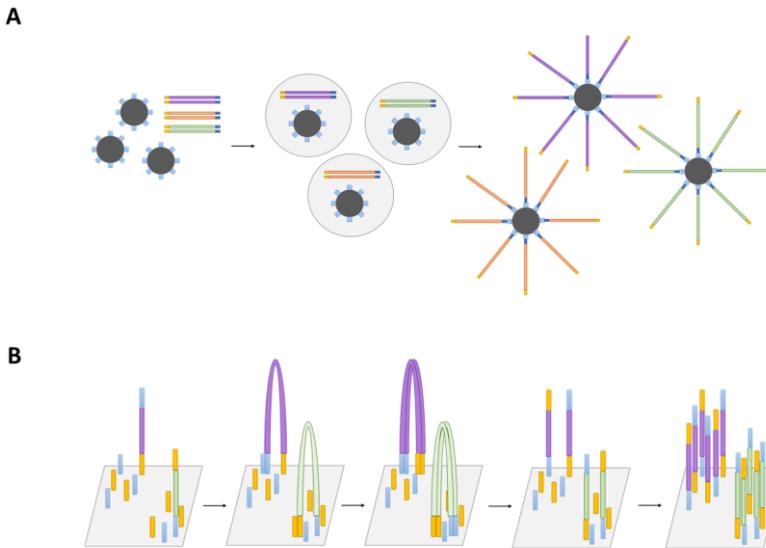


Figura 16: Representación esquemática de la amplificación mediante PCR en emulsión (A) y PCR puente (B).

Adicionalmente, se diferencian dos tipos de secuenciación, la secuenciación por síntesis y la secuenciación por ligación. La secuenciación por síntesis se basa en la incorporación de nucleótidos mediante el empleo de la ADN polimerasa, y la identificación del nucleótido incorporado mediante el empleo de terminadores marcados con fluoróforos, liberación de un pirofosfato o cambios en el pH. La secuenciación por ligación es un método enzimático de secuenciación que se lleva a cabo mediante la acción de la ADN ligasa (Goodwin *et al.*, 2016). Este mecanismo es propio de SOLID, y actualmente es una tecnología muy poco empleada (apartado 2.5.5).

5.2.2. Principales plataformas de secuenciación masiva

454 Life Sciences

Fue la primera plataforma de secuenciación de nueva generación comercializada (Margulies *et al.*, 2005). La amplificación se lleva a cabo mediante una PCR en emulsión, y su mecanismo de secuenciación es por síntesis, basado en la pirosecuenciación (apartado 5.1) (Tabla 10). Es capaz de proporcionar lecturas largas, de unas 700 pares de bases (pb). Esta tecnología está actualmente en desuso ya que ha sido sustituida por las nuevas plataformas.

SOLID (*Support Oligonucleotide Ligation Direction*)

Es la única plataforma de NGS que lleva a cabo secuenciación por ligación y codificación por dos bases. Su principal desventaja es la alta tasa de error y que ofrece lecturas cortas (75 pb), por lo que actualmente es una de las estrategias menos empleadas.

Illumina

La metodología Illumina se basa en la secuenciación por síntesis, mediante el empleo de ddNTPs marcados con fluoróforos que bloquean de forma reversible la síntesis de la cadena de ADN. Tras la amplificación por PCR puente en una placa de vidrio (apartado 5.2.1), se lleva a cabo la secuenciación mediante el bloqueo de uno de los adaptadores y comienzo de la reacción desde el otro extremo. A continuación se produce la incorporación simultánea de los ddNTPs

Introducción

que se unen a las secuencias de ADN complementarias, bloquean la elongación y se determina la identidad de la primera base de cada *cluster*. Posteriormente se eliminan los fluorocromos y se regenera el extremo 3'-OH con un agente reductor, permitiendo la realización de ciclos sucesivos, de nuevo con la incorporación de ddNTPs, adquisición de imagen y lavado (Figura 17).

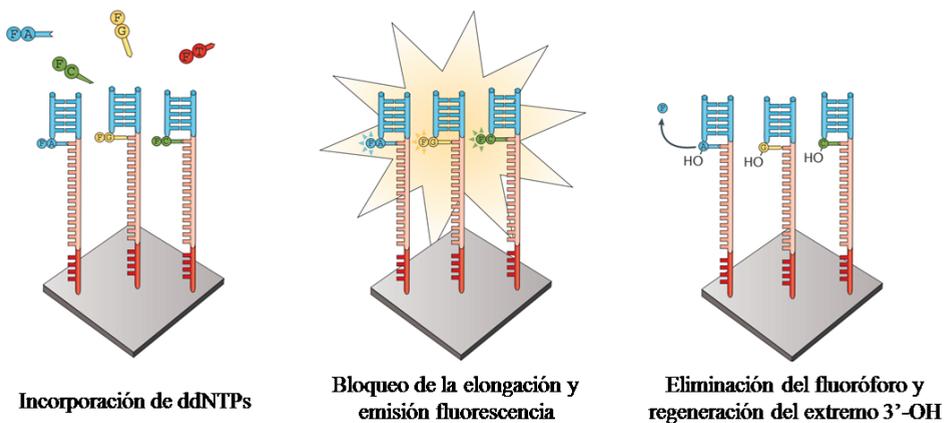


Figura 17: Reacción de secuenciación llevada a cabo por el método Illumina. Tomada de Goodwin *et al* (Goodwin *et al.*, 2016).

Al igual que la tecnología SOLID, Illumina ofrece lecturas cortas (150pb), pero con una gran capacidad de lecturas totales. Se han desarrollado varias plataformas (HiSeq, Miseq, NextSeq, entre otras) y actualmente constituye la tecnología de secuenciación de segunda generación más empleada.

Ion Torrent Sequencing

Es la primera plataforma comercializada cuya secuenciación no depende del uso de fluorescencia, sino que se basa en la tecnología de semiconductores, en la que se detectan cambios de pH como consecuencia de los protones (H^+) liberados en la reacción de polimerización del ADN (Rothberg *et al.*, 2011). El proceso se lleva a cabo mediante el uso de chips con micro-pocillos cuya base detecta dichos cambios en el pH (Figura 18). Se dispone de dos plataformas capaces de generar lecturas largas (hasta 2000 pb), el sistema PGM y otro sistema de mayor capacidad, el Ion Proton. La tecnología Ion Torrent es una de las más utilizadas en la práctica clínica dado el creciente desarrollo de paneles de secuenciación con aplicación en enfermedades concretas, para secuenciar un determinado grupo de genes de interés de manera rentable y eficiente.

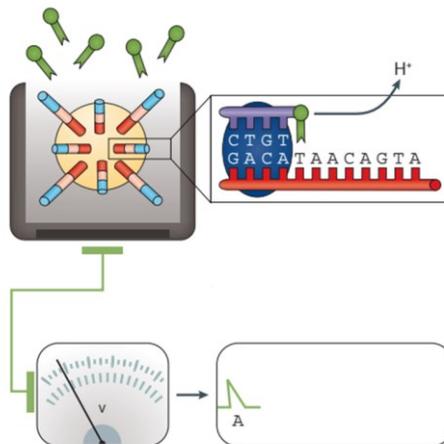


Figura 18: Reacción de secuenciación llevada a cabo por el Ion Torrent. Tomada de Goodwin *et al* (Goodwin *et al.*, 2016).

Introducción

Tabla 10: Principales plataformas de NGS

Plataforma	Tipo amplificación	Tipo secuenciación	Tamaño máximo de lectura (pb)
454	PCR emulsión	Síntesis (pirosecuenciación)	700
SOLID	PCR emulsión	Ligación oligonucleótidos marcados fluoróforos	75
Illumina	PCR puente	Síntesis (ddNTPs marcados con fluoróforos)	150
Ion Torrent	PCR emulsión	Síntesis (semiconductores)	2000

5.2.3. Aplicaciones de la secuenciación masiva

El reciente desarrollo de plataformas de NGS ha permitido realizar un cribado exhaustivo de las alteraciones moleculares implicadas en distintos procesos biológicos. Concretamente en cáncer, ha permitido la identificación de nuevos genes implicados en su patogenia con potencial aplicabilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Con respecto al melanoma, esta nueva metodología ha permitido no sólo identificar nuevos genes, sino también conocer un rasgo distintivo de esta neoplasia comparado con otras, como es la alta carga mutacional (mediana de >10 mutaciones/Mb en melanoma comparado con 0,3 mutaciones/Mb en la leucemia) (Lawrence *et al.*, 2013).

La NGS se emplea para la secuenciación del genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS), permitiendo conocer deleciones, inserciones, variaciones en el número de copias, translocaciones y cambios de base ocurridos en todo el genoma; para la secuenciación de todas las regiones genómicas codificantes (*Whole Exome Sequencing*, WES); o bien para el estudio únicamente de regiones codificantes seleccionadas mediante el uso de paneles de secuenciación (*Targeted exome sequencing*). A este respecto, los

estudios iniciales realizados mediante NGS se basaban en una secuenciación de tipo WGS o WES; sin embargo, estas aproximaciones tienen un coste muy elevado, y proporcionan una enorme cantidad de datos que requieren un análisis bioinformático complejo, por lo que no resultan de utilidad en el diagnóstico molecular de rutina. En este sentido, la secuenciación de regiones codificantes seleccionadas o *Targeted exome sequencing*, permite el análisis de alteraciones genéticas concretas, de manera que representa una modalidad de NGS de especial utilidad en la práctica clínica diaria. Esta alternativa permite una secuenciación más rápida, menos costosa y requiere un análisis bioinformático de menor complejidad.

La mayoría de los estudios realizados con *Targeted exome sequencing* en melanoma han empleado paneles de secuenciación comerciales que incluyen genes frecuentemente implicados en los distintos tipos de cáncer (Dutton-Regester *et al.*, 2012; Siroy *et al.*, 2015; Goswami *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Stockman *et al.*, 2015; Miraflor *et al.*, 2017; Carlson *et al.*, 2017). Estos paneles tienen la ventaja de que no requieren un diseño específico, y permiten el estudio de varios tipos de neoplasias sin necesidad de disponer de un panel determinado para cada una de ellas; sin embargo, tienen la limitación de que incluyen el análisis de múltiples genes sin implicación conocida en la patogenia del melanoma (Griewank *et al.*, 2015).

Como alternativa a estos paneles comerciales, una minoría de autores ha desarrollado paneles específicos que incluyen genes de relevancia en el melanoma (Tabla 11) (Lovly *et al.*, 2012; Pinto *et al.*,

Introducción

2016; Froyen *et al.*, 2016; Reiman *et al.*, 2017). En el diseño de dichos paneles se han incluido los principales genes con implicación conocida en el melanoma (*BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *KIT*, *GNAQ*, *GNA11*), si bien cabe destacar que en ninguno de ellos se han analizado genes recientemente descritos en estudios de WGS/WES (*NF1*, *RAC1*, *PPP6C*, *TERT*...), y prácticamente no se ha incluido el estudio de genes relacionados con los mecanismos de resistencia a las nuevas terapias dirigidas (*MEK1*, *MEK2*, *NF1*, *RAC1*, *HOXD8*, *CDK4*...).

Tabla 11: Estudios de NGS con diseños de paneles específicos empleados en el estudio de melanomas.

Autores	Tipo de muestras (n°)	Genes (n°)	Diseño	Genes
Lovly CM <i>et al.</i> , 2012	LC (6), F (24), FFPE (18)	6	Hotspots	<i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>KIT</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>GNAQ</i> , <i>GNA11</i>
Pinto R <i>et al.</i> , 2016	FFPE (25)	11	Toda región codificante	<i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , <i>PTEN</i> , <i>MITF</i> , <i>CDK4</i> , <i>MGMT</i> , <i>CTLA4</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>MC1R</i> , <i>KIT</i> , <i>RBI</i>
Froyen G <i>et al.</i> , 2016	FFPE (5)	24	Hot spots	<i>AKT1</i> , <i>ALK</i> , <i>APC</i> , <i>BRAF</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>GFR</i> , <i>ERBB2 (HER2)</i> , <i>FBXW7</i> , <i>FGFR2</i> , <i>GNA11</i> , <i>GNAQ</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>MET</i> , <i>NRAS</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>PPIK3CA</i> , <i>PTEN</i> , <i>RET</i> , <i>SMAD4</i> , <i>STK11</i> , <i>TP53</i>
Reiman A <i>et al.</i> , 2017	FFPE (151)	7	Hot spots	<i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>GNAQ</i> , <i>GNA11</i> , <i>MEK1</i>

LC: Líneas celulares; FFPE: Muestra parafinada; F: Muestra en fresco; NE: No especificado; Mtx: Metástasis

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El melanoma es una neoplasia maligna con un importante impacto clínico en nuestro medio. Diversos estudios han constatado que es uno de los tumores cuya incidencia más ha aumentado en las últimas décadas, y que constituye la principal causa de muerte por cáncer cutáneo en el mundo.

La clasificación tradicional del melanoma cutáneo establece cuatro subtipos de melanoma con características clínico-patológicas diferenciales; sin embargo, esta clasificación resulta insuficiente al carecer de valor pronóstico. A su vez, a pesar de los recientes avances en el conocimiento de las alteraciones moleculares implicadas en su etiopatogenia, las alternativas terapéuticas del melanoma localmente avanzado y/o metastásico continúan siendo limitadas y las tasas de supervivencia continúan siendo bajas. Es por ello que resulta necesario profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y progresión del melanoma, con el fin de identificar nuevos biomarcadores con utilidad clínica. Una caracterización del melanoma mediante una aproximación genómica y epigenómica podría ayudarnos a establecer una nueva clasificación del melanoma basada en subtipos moleculares, que a diferencia de la clasificación clínico-patológica actual, permita estratificar a nuestros pacientes en base al pronóstico, y a su vez tenga implicaciones terapéuticas.

El reciente desarrollo de la NGS ha permitido un análisis exhaustivo de las alteraciones moleculares implicadas en la patogenia del melanoma. La mayoría de los estudios de NGS se basan en aproximaciones WGS y WES, que suponen un alto coste y requieren un manejo bioinformático de elevada complejidad. La secuenciación

Justificación y objetivos

de regiones exónicas específicas mediante la aplicación de paneles de genes específicos ha demostrado mayor utilidad en la práctica clínica por su menor coste y una mayor facilidad para la interpretación de los resultados; sin embargo, son escasos los diseños de paneles centrados únicamente en el estudio de los genes implicados en melanoma. El diseño de un panel de genes específico de melanoma podría ser de utilidad no sólo para la clasificación de los melanomas primarios en base a sus alteraciones genéticas, sino también para el manejo de los melanomas metastásicos mediante la identificación de dianas terapéuticas, así como posibles mecanismos de resistencia a las actuales terapias dirigidas.

Por todo lo anteriormente expuesto, el **objetivo principal** de esta tesis doctoral es la caracterización molecular de una serie de melanomas mediante una aproximación genética y epigenética, para tratar de establecer una clasificación molecular que tenga valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

Para alcanzar este objetivo principal se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudio del perfil genético.

1.1 Diseño y puesta a punto de un panel de genes descritos previamente en la literatura con utilidad diagnóstica, pronóstica y/o predictiva de respuesta en el melanoma, para su estudio por NGS.

1.2 Estudio de la prevalencia de mutaciones de los diferentes genes incluidos en el panel en una serie de melanomas primarios.

1.3 Estudios de asociación de las mutaciones identificadas con los parámetros clínico-patológicos y evolutivos de los pacientes.

1.4 Establecimiento de una clasificación molecular en base a las mutaciones identificadas (siguiendo los criterios de la TCGA).

1.5 Estudio de la prevalencia de mutaciones en muestras pareadas de melanoma metastásico.

2. Estudio de los perfiles de metilación aberrante del ADN.

2.1. Estudio de la prevalencia de metilación en TSGs en una serie de melanomas primarios.

2.2 Estudios de asociación de la metilación con los parámetros clínico-patológicos y evolutivos de los pacientes.

Justificación y objetivos

3. Estudio de los perfiles de expresión de miRNAs.

2.1. Estudio del perfil de expresión de miRNAs en una serie de melanomas primarios.

2.2 Selección y validación de los miRNAs seleccionados en una segunda serie de muestras.

2.3 Estudios de asociación de la expresión de los miRNAs seleccionados con los parámetros clínico-patológicos y evolutivos de los pacientes.

2.4 Estudio de los miRNAs seleccionados en una serie de nevus melanocíticos y melanomas metastásicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

Estudio observacional retrospectivo efectuado en 210 pacientes diagnosticados de melanoma desde 2005-2017 en los Servicios de Dermatología y Anatomía Patológica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe (n=113), Hospital General Universitario de Valencia (n=75), Hospital La Plana de Villarreal (n=20) e Instituto Valenciano de Oncología (n=2). Adicionalmente, el estudio ha incluido una serie de 20 pacientes diagnosticados de nevus melanocíticos y un grupo control (n=10) de pacientes sin antecedentes personales ni familiares de cáncer (Hospital Universitario y Politécnico la Fe). Las Tablas 12A y 12B recogen las características epidemiológicas, clínicas, histopatológicas y evolutivas de los pacientes diagnosticados de melanoma y nevus melanocítico, respectivamente; los pacientes con melanoma *in situ* han sido excluidos del estudio.

Todos los pacientes han manifestado por escrito su aprobación para participar en el estudio. El consentimiento informado ha sido elaborado de acuerdo con las directrices recogidas en la Declaración de Derechos Humanos y Conferencia de Helsinki y los requisitos establecidos en la legislación valenciana y española en el ámbito de investigación biomédica. Asimismo, el proyecto de investigación ha sido aprobado por el respectivo Comité Ético de Investigación Clínica de los hospitales anteriormente mencionados.

Material y métodos

1.2 MUESTRAS A ESTUDIO

Se han obtenido 210 muestras de melanoma primario y 12 de metástasis, así como 20 muestras correspondientes a nevus melanocíticos. Todas las muestras habían sido incluidas en parafina y almacenadas en los archivos de los Servicios de Anatomía Patológica y Dermatología. Para las determinaciones moleculares se han seleccionado la muestras con mayor porcentaje de células tumorales, excluyéndose aquéllas con <20% de celularidad tumoral. Adicionalmente, muestras de piel sana (n=10) han sido utilizadas como grupo control en los estudios moleculares.

Tabla 12A: Características clínico-patológicas de los pacientes diagnosticados de melanoma.

Variable	Total (n=210) n (%)
Características epidemiológicas	
Edad	
<40	20 (9,5)
40-65	98 (46,7)
>65	92 (43,8)
Sexo (%)	
Varones	108 (51,4)
Mujeres	102 (48,6)
Características clinicopatológicas	
Localización anatómica (%)	
Cabeza y cuello	30 (14,3)
Tronco	94 (44,8)
Extremidades superiores	37 (17,6)
Extremidades inferiores	35 (16,7)
Acral	14 (6,7)
Fotolocalización (%)	
Oculto sol	31 (14,8)
Exposición intermitente	150 (71,4)
Exposición crónica	29 (13,8)

Tabla 12A: Continuación

Subtipo histológico (%)	
LMM	16 (7,6)
MES	151 (71,9)
MN	28 (13,3)
MLA	13 (6,2)
Otros	2 (1,0)
Índice de Breslow (%)	
<1mm	118 (56,2)
1-2mm	45 (21,4)
2-4mm	24 (11,4)
>4mm	23 (11,0)
Ulceración (%)	
No	168 (80,0)
Sí	42 (20,0)
Mitosis /mm² (%)	
<1	110 (52,4)
≥1	100 (47,6)
Regresión (%)	
No	116 (55,2)
<50%	68 (32,4)
>50%	26 (12,4)
Tasa de crecimiento (%)	
Non-FGM	173 (82,4)
FGM	37 (17,6)
BSGC (%)	
No realizado	103 (49,0)
Negativo	81 (38,6)
Positivo	17 (8,1)
No identificado	9 (4,3)
Estadio tumoral (%)	
Localizado (I-II)	175 (83,3)
Locorreional y metastásica (III-IV)	35 (16,7)
Evolución (%)	
Enfermedad estable	172 (82,7)
Recaída (locorreional y/o metástasis a distancia)	26 (12,5)
Exitus	10 (4,8)

LMM: Lentigo Melanoma Maligno; MES: melanoma extensión superficial; NM: Nodular melanoma; MLA: melanoma lentiginoso acral; FGM: *Fast growing melanoma*. BSGC: Biopsia selectiva de ganglio centinela.

Material y métodos

Tabla 12B: Características clínico-patológicas de los pacientes diagnosticados de nevus melanocíticos.

Variable	Total (n=20) n (%)
Características epidemiológicas	
Edad	
<40	5 (25)
40-65	11 (55)
>65	4 (20)
Sexo (%)	
Varones	6 (30)
Mujeres	14 (70)
Características clinicopatológicas	
Localización anatómica (%)	
Cabeza y cuello	2 (10)
Tronco	17 (85)
Extremidades superiores	0 (0)
Extremidades inferiores	1 (5)
Acral	0 (0)
Subtipo histológico (%)	
Nevus intradérmico	4 (20)
Nevus compuesto	6 (30)
Nevus displásico	10 (50)

2. MÉTODOS

2.1 PLAN DE TRABAJO

De los todos casos incluidos en el estudio, se han solicitado cortes del tejido tumoral incluido en parafina (FFPE) a los servicios de Dermatología y Anatomía Patológica. El aislamiento de ADN y ARN para su posterior empleo en los métodos moleculares propuestos ha sido realizado a partir de muestras FFPE. El estudio de alteraciones moleculares mediante *Next-Generation Sequencing* (NGS), PCR en tiempo real [análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM; *High Resolution Melting*) y sistema de mutación refractario a la amplificación por PCR (ARMS-PCR)] y secuenciación de Sanger, se ha realizado sobre ADN; así como el estudio de la metilación en el

promotor de TSGs mediante amplificación múltiple empleando sondas dependientes de una fase de ligación sensible a la metilación (MS-MLPA). El perfil de expresión de miRNAs mediante *arrays* de expresión y su posterior validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) se ha realizado sobre ARN. La figura 19 muestra el algoritmo de trabajo establecido.

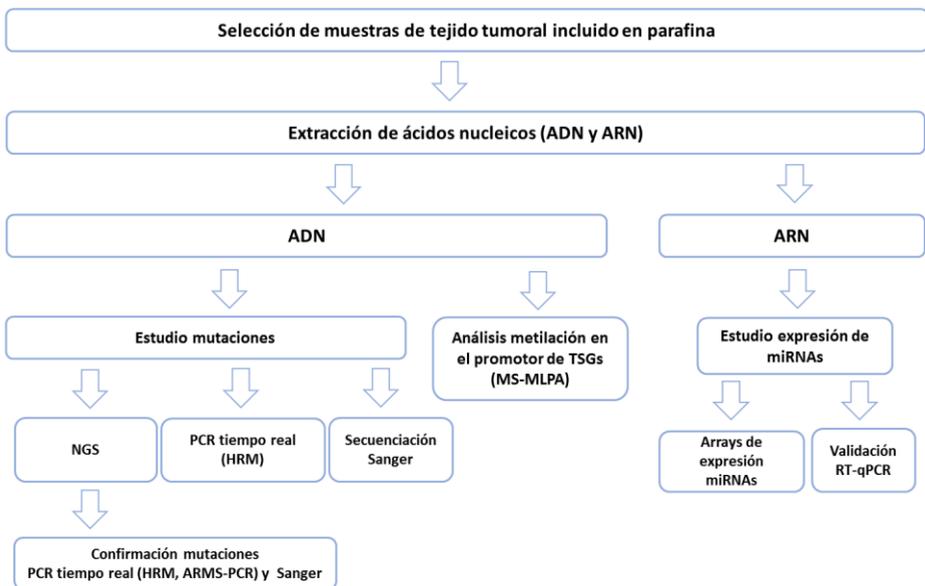


Figura 19: Diagrama de flujo utilizado para los estudios moleculares

Material y métodos

2.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se ha realizado a partir de tres secciones de 10µm de tejido FFPE que inicialmente ha sido desparafinado mediante la utilización de 160 µl de la Solución de Desparafinado (Qiagen). Posteriormente se ha empleado como método de extracción en columna el *GeneRead DNA FFPE Kit* (Qiagen). Este procedimiento de aislamiento y purificación se basa en la adsorción del ADN (a través de sus grupos fosfato) a la membrana de sílice (cargada positivamente) de las columnas. Las proteínas, lípidos, metabolitos y otros contaminantes no son afines a la membrana y se eliminan con ayuda de una solución de lavado y un ciclo de centrifugación, mientras que el material genético permanece unido a la matriz. Adicionalmente se ha realizado una incubación con *UNG* (*Uracil-N-Glycosylase*), que es de especial utilidad para los estudios de secuenciación, ya que previene la formación de artefactos como consecuencia de la desaminación oxidativa de la citosina secundaria a la fijación con formaldehído (cambios en la secuencia tipo C>T).

El procedimiento de extracción comporta la incubación y digestión durante toda la noche a 56°C y posteriormente una hora a 90°C, con una mezcla de 55 µl de agua libre de nucleasas, 25 µl de Buffer FTB, y 20 proteinasa K. La fase acuosa generada tras la digestión se transfiere a un nuevo tubo, se le añaden 115 µl de agua libre de nucleasas y se incuba durante una hora con 35 µl de UNG a 50°C, seguido de una incubación a temperatura ambiente con 2 µl

RNasa A durante 2 minutos. Posteriormente se añaden 250 µl Buffer AL y 250 µl de etanol (96–100%) y se transfiere todo el lisado a la columna. A continuación se realizan los lavados de la columna con 500 µl Buffer AW1 y AW2, y finalmente se realiza la elución en 30 µl de Tris Edta (TE), permitiendo la obtención del ADN purificado.

2.2.2 Extracción de ARN

El ARN total de las muestras se ha purificado mediante el Kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* (ThermoFisher Scientific). Se han disgregado y desparafinado tres secciones de 20µm de tejido mediante 160 µl de la Solución de Desparafinado (Qiagen).

Para aislar el ARN, la muestra se digiere con 100 µl de *Digestion Buffer* y 4 µl de proteasa a 50°C durante 3 horas seguido de 15 minutos a 80 °C. Una vez digerida, la fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo de microcentrífuga y se añade una mezcla de 120 µl *Isolation Additive* y 275 µl de etanol al 100%. Todo el contenido del tubo se transfiere a la columna y posteriormente se realizan los lavados con los *Buffer Wash 1* y *Wash 2/3*. A continuación se realiza una digestión con nucleasas mediante la adición de una mezcla de 6 µl de 10X *DNase Buffer*, 4 µl de *DNase* y 50 µl de agua libre de nucleasas, y se repiten los lavados con los *Buffer Wash 1* y *Wash 2/3*. Finalmente se realiza la elución en 30 µl de agua libre de nucleasas.

Material y métodos

2.2.3 Cuantificación y valoración de la calidad de los ácidos nucleicos

La cantidad y calidad de ADN/ARN se ha determinado mediante espectrofotometría utilizando el *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific). El *Nanodrop* calcula la concentración de los ácidos nucleicos en ng/μl y evalúa la pureza mediante el ratio entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm (1,8-2,0) y el ratio entre 260 nm y 230 nm (1,8-2.2). Valores fuera de los rangos indican la presencia de contaminantes que absorben a longitudes de onda similares, tales como proteínas, fenoles, hidratos de carbono o compuestos aromáticos.

De forma adicional, la concentración de ADN ha sido determinada mediante fluorimetría utilizando el *Qubit 3.0 Fluorometer* (ThermoFisher Scientific). Este método de cuantificación permite determinar la concentración de la muestra mediante la utilización de sondas fluorescentes de forma altamente sensible y precisa. La cuantificación de ácidos nucleicos mediante fluorimetría resulta de especial utilidad para la preparación de librerías en los estudios de NGS.

Asimismo, la calidad del ARN ha sido determinada mediante electroforesis en el *Agilent 2100 Bioanalyzer system* utilizando el *kit Agilent RNA 6000 Nano*. Este método mide la integridad del ARN mediante la estimación del *RNA Integrity Number* (RIN) que tiene un rango numérico del 1 (muestra degradada) al 10 (muestra íntegra). Los ácidos nucleicos procedentes de tejidos parafinados sufren

degradación consecuencia de su exposición a la formalina, mostrando valores del RIN bajos. Para el estudio de expresión de miRNAs mediante *arrays* únicamente se han seleccionado las muestras FFPE que han proporcionado un valor de RIN aceptable para el estudio (RIN = 2-3).

2.3 ESTUDIOS GENÉTICOS

El estudio de mutaciones se ha realizado mediante tres métodos moleculares: NGS, PCR en tiempo real y secuenciación de Sanger.

- NGS: estudio de alteraciones moleculares mediante el diseño de *novo* de un panel de 35 genes implicados en la patogenia del melanoma.
- PCR en tiempo real: confirmación de mutaciones identificadas mediante NGS en los genes *NRAS* y *KRAS*. Uso de la aproximación de HRM para el estudio de mutaciones en el gen *IDHI*, y confirmación de mutaciones del gen *BRAF* identificadas por NGS.
- Secuenciación de Sanger: estudio de mutaciones en el promotor del gen *TERT* y el gen *IDHI*; confirmación de las mutaciones identificadas por NGS en los genes *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, y *KIT*.

Material y métodos

2.3.1 Estudio de alteraciones moleculares mediante secuenciación masiva

2.3.1.1 Selección de genes y diseño del panel

2.3.1.1.1 Selección de genes

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica con el fin de revisar genes previamente descritos en melanoma. Para ello se ha utilizado la base de datos PUBMED (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). En la búsqueda se han incluido los registros publicados hasta el 1 de diciembre del 2014 utilizando los siguientes términos de búsqueda: “Melanoma” AND “mutations”; “Melanoma” AND “Genetics”; “Melanoma” AND “Next-Generation Sequencing”; “Melanoma” AND “Whole Exome sequencing”; “Melanoma” AND “Whole Genome sequencing”; y “Melanoma” AND “Targeted Exome sequencing”.

Para la selección de los genes candidatos se ha tomado en consideración su clasificación en tres grupos en función de su implicación en el melanoma:

- Grupo I: Genes bien conocidos por su implicación en la patogenia del melanoma.
- Grupo II: Genes con mutaciones descritas como posibles mecanismos de resistencia a terapias dirigidas empleadas en pacientes con melanoma avanzado.
- Grupo III: Genes recientemente descritos en estudios WGS/WES, cuya implicación en la patogenia del melanoma es desconocida.

De cada uno de los genes seleccionados se ha revisado la presencia de “regiones calientes” o “*hot spots*”, que son regiones

exónicas donde es frecuente que se produzcan mutaciones. En aquellos genes en los que no se han identificado “*hot spots*”, se han revisado las regiones donde previamente han sido descritas mutaciones por otros autores.

2.3.1.1.2Diseño del panel

El diseño se ha realizado utilizando la herramienta *Ion Ampliseq Designer* (www.ampliseq.com). La herramienta permite la inclusión de toda la región codificante de un gen, o bien de las regiones exónicas de interés mediante la anotación de cada una de las posiciones cromosómicas (Figura 20). Por ello, en función de si existen o no “*hot spots*” en el gen seleccionado se han indicado las posiciones cromosómicas a estudiar o se ha incluido el estudio del gen completo, respectivamente. Para la búsqueda de las posiciones cromosómicas de cada región se han consultado las bases de datos *UCSC Genome Browser* y *COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)*.

Finalizado el proceso de diseño del panel, la herramienta *Ion Ampliseq Designer* proporciona una descripción del mismo indicando los amplicones generados así como la cobertura con la que se leerán cada una de las regiones de estudio en el secuenciador.

Material y métodos

A

Name	Chrom	Start	End	Target (bp)	Missed (bp)	Covered (%)
MAP2K1 111	chr15	66729119	66729129	10	0	100
MAP2K1 60	chr15	66727458	66727468	10	0	100
MAP2K1 154	chr15	66735635	66735645	10	0	100
MAP2K1 203	chr15	66774126	66774136	10	0	100
MAP2K1 276	chr15	66777455	66777465	10	0	100
MAP2K1 387	chr15	66782925	66782935	10	0	100
MAP2K2 35	chr19	4117610	4117620	10	0	100
MAP2K2 46	chr19	4117578	4117588	10	0	100
MAP2K2 125-126	chr19	4110575	4110585	10	0	100
MAP2K2 154	chr19	4102436	4102446	10	0	100
MAP2K2 207	chr19	4101096	4101106	10	0	100

B

Name	Chrom	Start	End	Target (bp)	Missed (bp)	Covered (%)
PTEN				1.302	79	93.93
PREX2				5.456	269	95.07
ERBB4				4.207	16	99.62
GRIN2A				4.515	128	97.16
MET				4.427	31	99.3

Figura 20: Ejemplo de diseño del panel proporcionado por la herramienta *Ampliseq Designer*.

A: Se especifica para cada “*hot spot*” la posición cromosómica de inicio y fin del amplicón, el número de pares de bases incluidas, y la cobertura con la que son leídas por el secuenciador.

B: Detalle del diseño para genes sin “*hot spots*” o con mutaciones a lo largo de todo el gen, en los que se incluye el estudio de toda la región codificante y la herramienta proporciona la cobertura para dicho gen.

2.3.1.2 Preparación de librerías

La preparación de librerías según la tecnología empleada, requiere una amplificación mediante PCR múltiple seguida de la ligación de los adaptadores e identificadores (*barcodes*). La figura 21 ilustra el flujo de trabajo seguido para la preparación de librerías.

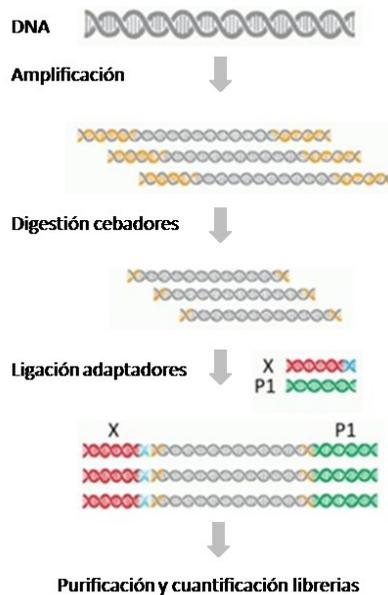


Figura 21: Diagrama de flujo utilizado para la preparación de librerías.

2.3.1.2.1 Amplificación

La preparación de librerías se ha realizado mediante el *Ion Ampliseq Library kit 2.0* (Thermo Fisher Scientific). Esta tecnología permite una amplificación de todas las regiones genómicas mediante PCR múltiple en una placa de 96 pocillos, mediante la preparación de dos *pool* de parejas de cebadores. El procedimiento se lleva a cabo

Material y métodos

empleando 10 ng de ADN medidos mediante fluorimetría (Qubit 3.0) para cada uno de los *pool*. El protocolo y programa de temperaturas de PCR se especifican en las tablas 13 y 14. El número de ciclos de PCR se ajusta en función del número de parejas de cebadores por *pool*, acorde a las especificaciones del fabricante.

Tabla 13: Protocolo de trabajo empleado para la preparación de las librerías.

Reactivo	Volumen (µl)
<i>Ion AmpliSeq Hifi Mix</i>	4
<i>Ion AmpliSeq Primer Pool</i>	10
ADN (10 ng)	6

Tabla 14: Programa de temperaturas de PCR empleado para la preparación de las librerías

Nº Ciclos	Paso	T ^a (°C)	Tiempo
1	Activación de la enzima	99	2 minutos
20	Desnaturalización	99	15 segundos
	Hibridación y elongación	60	4 minutos

2.3.1.2.2 Digestión de los cebadores

Los restos de cebadores del producto de PCR se eliminan mediante la adición de 2 µl de *FuPa Reagent*. El programa utilizado en el termociclador se especifica en la tabla 15.

Tabla 15: Programa de temperaturas empleado en el termociclador para la digestión de los cebadores remanentes.

T ^a (°C)	Tiempo (minutos)
50	10
55	10
60	20

2.3.1.2.3 Ligación de adaptadores y purificación de las librerías

Para la ligación de los adaptadores e identificadores a las muestras se prepara una mezcla de *Ion P1 Adapter* y *Ion Xpress Barcode* a una dilución 1:4 para cada uno de los identificadores. Una vez preparada, se lleva a cabo la reacción de ligación siguiendo el protocolo y programa de temperaturas especificado en las tablas 16 y 17.

Tabla 16: Protocolo de trabajo seguido para la ligación de los adaptadores e identificadores.

Reactivo	Volumen (µl)
<i>Ion P1 Adapter</i> y <i>Ion Xpress Barcode</i> (dilución 1:4)	2
<i>Switch Solution</i>	4
<i>DNA Ligase</i>	2

Material y métodos

Tabla 17: Programa de temperaturas empleado para la ligación de los adaptadores e identificadores.

T ^a (°C)	Tiempo (minutos)
22	10
72	10

La purificación de las librerías se realiza añadiendo 45 µl de microesferas *Agencourt® AMPure® XP* (Beckam Coulter). La mezcla se incuba durante 5 minutos colocando la placa en la gradilla magnética *DynaMag®-PCR magnet*, lo que conlleva la unión de los productos de PCR a las microesferas magnéticas. Una vez desechado el líquido sobrenadante se realizan dos lavados con 150 µl de etanol al 70%.

2.3.1.2.4 Ecuación o normalización de la concentración de las librerías

La concentración de las librerías se normaliza a 100 pM mediante la utilización del *Ion Library Equalizer Kit*. Este método requiere la amplificación de la librería siguiendo el protocolo y programa de temperaturas especificados en las tablas 18 y 19.

Tabla 18: Protocolo de trabajo empleado para la ecuación de las librerías.

Reactivo	Volumen (µl)
<i>Platinum® PCR SuperMix</i>	4
<i>Equalizer™ Primers</i>	2

Tabla 19: Programa de temperaturas empleado para la ecualización de las librerías.

Nº Ciclos	Paso	T ^a (°C)	Tiempo
1	Activación de la enzima	99	2 minutos
20	Desnaturalización	99	15 segundos
	Hibridación y elongación	60	4 minutos

2.3.1.3 Amplificación clonal y enriquecimiento

La amplificación clonal y enriquecimiento se han realizado mediante el *Ion OneTouch™ 2 System*.

Para la amplificación clonal se utiliza el *Ion OneTouch™ 2 Instrument* en el que se lleva a cabo una PCR en emulsión. La metodología emplea microesferas magnéticas [*Ion Sphere™ Particles (ISPs)*] a las que se une un único fragmento de ADN mediante una secuencia complementaria al adaptador P1. Las ISPs se emulsionan en una mezcla de agua y aceite, y se realizan miles de reacciones de PCR independientes (Figura 22).

Material y métodos

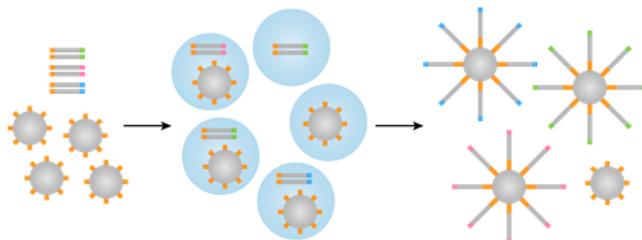


Figura 22: Representación esquemática de la PCR en emulsión.

En un primer paso se realiza una dilución de la librería de ADN a 100 pM, mediante la mezcla de un volumen de 2 μL de la librería y agua de agua libre de nucleasas hasta un volumen total de 25 μL . Posteriormente, se prepara la solución de amplificación siguiendo el protocolo especificado en la tabla 20.

Tabla 20: Protocolo de trabajo empleado para PCR en emulsión.

Reactivo	Volumen (μl)
<i>Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix</i>	800
<i>Ion PGM Hi-Q Enzyme Mix</i>	50
<i>Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs</i>	100
Librería (100 pM)	25
Agua libre de nucleasas	25

Se introducen 1000 μl de la solución de amplificación en el *Ion OneTouch™ Reaction Filter*, seguido de 1700 μl de *Ion OneTouch™ Reaction Oil*. A continuación, el filtro se inserta en el *Ion OneTouch™ 2 Instrument* para llevar a cabo la amplificación clonal mediante el programa *Ion Torrent PGM Hi-Q OT2 kit 200*. Una vez terminada la PCR en emulsión y tras una centrifuga de 10 minutos, las ISPs se depositan en los tubos de colección (*Ion OneTouch™ Recovery*

Tubes). De cada tubo se elimina todo el sobrenadante sin tocar el pellet, excepto un volumen de 100 μL que se utiliza para resuspender las ISPs. Posteriormente, a cada tubo se le añaden 500 μl de *Ion OneTouch™ Wash Solution*. El volumen resultante de ambos tubos colección se mezcla en un solo tubo *Eppendorf LoBind™*, y tras ser centrifugado, se deshecha el sobrenadante excepto un volumen de 100 μL que se emplea para el enriquecimiento.

El enriquecimiento de las ISPs se realiza con el *Ion OneTouch™ ES*. Este paso comporta la selección de las ISPs que contienen un fragmento de ADN amplificado y la eliminación de las ISPs sin amplicón, mediante la utilización de esferas magnéticas unidas a estreptavidina que se unen al adaptador A biotinilado. El procedimiento requiere el empleo de una tira de 8 pocillos donde se añaden todos los reactivos necesarios. En el primer pocillo se añaden 100 μL de las ISPs, en el segundo pocillo se añaden 130 μL de *Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads*, en los pocillos 3°-5° se añaden 300 μL del *Ion OneTouch™ Wash Solution*, y en el séptimo pocillo 300 μL de solución *Melt-off*.

Material y métodos

2.3.1.4 Secuenciación

La secuenciación se ha llevado a cabo en el *Ion PGM System*. Esta tecnología emplea chips semiconductores y se basa en la detección de cambios de pH como consecuencia de los protones liberados en la reacción de polimerización del ADN (Figura 23).

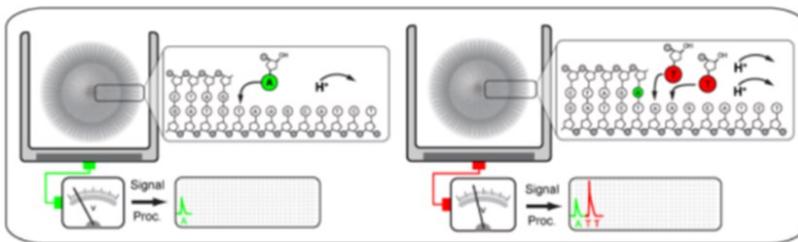


Figura 23: Esquema del método de secuenciación mediante semiconductores.

En primer lugar se le añaden a las ISPs enriquecidas 5 μL de *Control Ion Sphere™ Particles* y se centrifuga 2 minutos a $15,500 \times g$. Se elimina el sobrenadante sin tocar el *pellet* hasta dejar un volumen de 15 μL , y posteriormente se añaden 12 μL de *Sequencing Primer* hasta alcanzar un volumen total de 27 μL . La mezcla se incuba 2 minutos a 95°C y 2 minutos a 37°C . A continuación se añaden 3 μL de *Ion PGM Sequencing 200 v2 Polymerase* hasta alcanzar un volumen de 30 μL , y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina el contenido del *Ion 318 Chip v2* y se procede a cargar los 30 μL en el chip. Una vez cargado, se coloca en la placa del *Ion PGM Sequencer* y se inicia el proceso de secuenciación.

2.3.1.5 Análisis bioinformático

Para realizar el análisis bioinformático, los datos han sido transferidos desde el *Ion PGM System* al servidor (*Ion PGM Torrent Server*). El análisis inicial de los datos para la anotación de variantes se ha realizado mediante el *Ion Torrent Suite Software*. El filtrado inicial de las variantes se ha realizado mediante el *Ion Reporter software*.

2.3.1.6 Estudios de sensibilidad

La determinación del LoD de la metodología de NGS se ha realizado mediante la secuenciación de dos líneas celulares de adenocarcinoma de colon. Una de las líneas empleadas ha sido la HT-29 (ACC-299) que es portadora de la mutación p.val600Glu en heterocigosis en el gen *BRAF* y el polimorfismo p.Arg160Trp en el gen *MC1R*, y la otra línea ha sido la Caco-2 (ACC-169) que es *wt* para las dos variantes mencionadas. Con el ADN genómico de ambas líneas celulares se han realizado diluciones seriadas en una proporción 1:1, 1:3, 1:24, 1:49, 1:99, 1:999, dando lugar a frecuencias alélicas del 25%, 12.5%, 2%, 1%, 0.5% y 0.05%, respectivamente. Cada una de las diluciones resultantes ha sido secuenciada en dos experimentos independientes siguiendo la metodología descrita para las muestras de tejido.

Material y métodos

2.3.1.7 Clasificación de las variantes identificadas

Para una adecuada clasificación de variantes patogénicas se han definido unos criterios de selección (Figura 24). Todas las variantes intrónicas y exónicas sinónimas han sido inicialmente excluidas. Asimismo, se han aplicado filtros para eliminar posibles falsos positivos, teniendo en cuenta únicamente aquellas variantes con un número de lecturas totales o cobertura ≥ 500 , un número de lecturas en el alelo mutado ≥ 20 , y un p valor $< 0,01$.

Además se ha realizado una búsqueda de las variantes filtradas en las bases de datos COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) y dbSNP (*database for single nucleotide polymorphisms*) para identificar mutaciones y polimorfismos previamente descritos. Para dilucidar el papel patogénico de las variantes de origen desconocido (VEDs) se han utilizado programas de predicción “*in silico*”. Estas herramientas tienen como objetivo la predicción de los efectos funcionales proteicos derivados de los cambios en el aminoácido estableciendo una puntuación (*score*). Los programas utilizados han sido SIFT (*Sorting Intolerant from Tolerant*), Polyphen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*), Provean (*Protein Variation Effect Analyzer*), CONDEL (*consensus deleteriousness score of missense mutations*) y SNPS&GO. Se han considerado variantes patogénicas aquellas con predicción deletérea en tres de los cinco algoritmos empleados, así como las variantes tipo *frameshift* y *nonsense*.

Adicionalmente, todas las mutaciones y VEDs clasificadas como patogénicas han sido confirmadas mediante su visualización en

el software *Integrative Genomics Viewer* (IGV; Broad Institute, Reino Unido). (Version 2.3).

Los polimorfismos identificados en genes previamente descritos por su contribución a la predisposición del melanoma (*CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R* y *MITF*), también han sido clasificados mediante las herramientas de predicción “*in silico*”. Se han considerado polimorfismos de alto riesgo aquéllos con predicción deletérea en tres de los cinco algoritmos empleados.

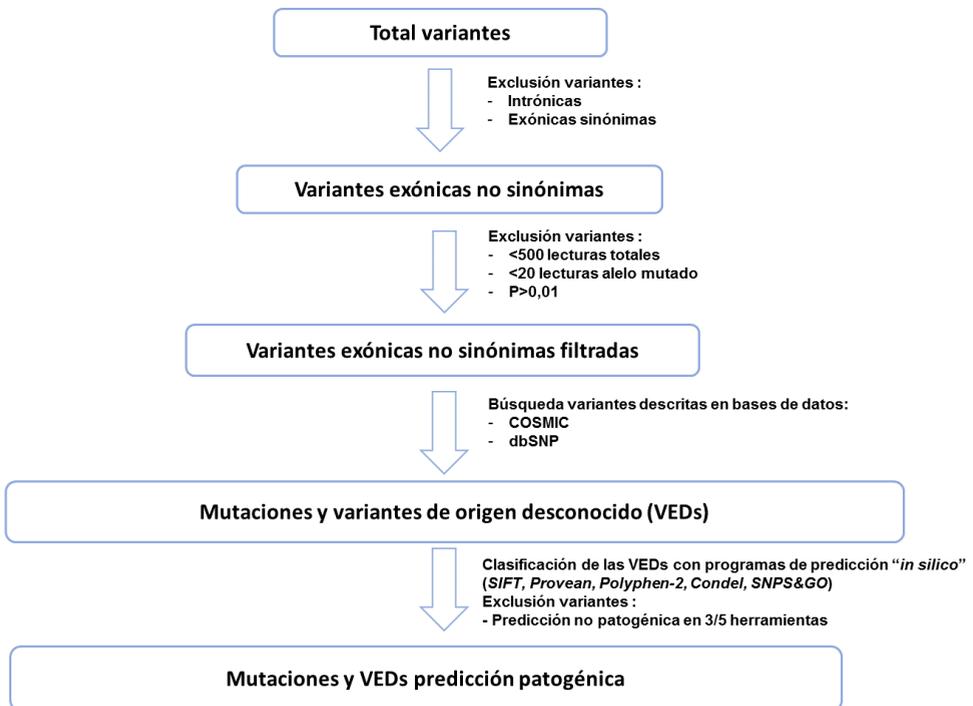


Figura 24: Diagrama de flujo seguido en la clasificación de variantes. Se indican los criterios aplicados para la selección y clasificación de las variantes patológicas.

Material y métodos

2.3.1.8 Confirmación de las mutaciones identificadas

La confirmación de las mutaciones identificadas en los genes *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, y *KIT* se ha realizado, en la Unidad de Biología Molecular (UBM; Laboratorio con certificación ISO 15.189; Hospital Universitarios y Politécnico La Fe) mediante los métodos empleados en la rutina asistencial.

Confirmación de las mutaciones en *BRAF*

Se ha realizado mediante HRM acorde a lo que se describe en el apartado 2.3.2.2. Las mutaciones del gen *BRAF* identificadas por NGS fuera del codón V600 han sido estudiadas por secuenciación de Sanger acorde a lo descrito en el apartado 2.3.3.

Confirmación de las mutaciones en *NRAS* y *KRAS*

Las mutaciones en los genes *NRAS* y *KRAS* han sido confirmadas mediante PCR en tiempo real en la plataforma *Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems* utilizando *AmoyDx® KRAS/NRAS Mutations Detection Kit* acorde a lo que se describe en el apartado 2.3.2.1. Aquellas mutaciones identificadas mediante NGS no valorables por esta metodología han sido estudiadas mediante secuenciación de Sanger acorde a lo descrito en el apartado 2.3.3.

Confirmación de las mutaciones en *KIT*

Han sido confirmadas mediante secuenciación de Sanger acorde a lo descrito en el apartado 2.3.3.

2.3.2 Estudio de mutaciones mediante PCR en tiempo real

2.3.2.1 Estudio de mutaciones mediante sistema de mutación refractario a la amplificación por PCR o ARMS-PCR

La confirmación de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* se ha realizado mediante PCR en tiempo real empleando *AmoyDx*® *KRAS Mutation Detection* y *AmoyDx*® *NRAS Mutation Detection Kit* (Amoy Diagnostics), respectivamente. Este kit emplea la tecnología ARMS (*Amplification-refractory mutation system*) para la detección de mutaciones puntuales. Consiste en un ensayo de PCR a tiempo real que emplea cebadores de PCR específicos para la mutación. Estos cebadores presentan en el extremo 3' un nucleótido complementario al nucleótido mutado, de esta manera, en muestras *wt* el cebador no hibrida adecuadamente y no hay amplificación (Figura 25).

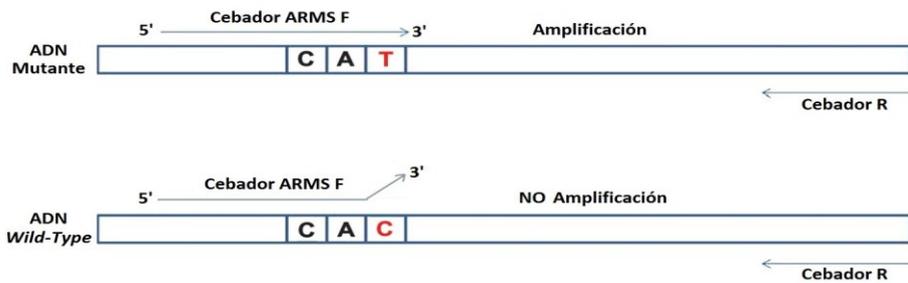


Figura 25: Fundamento de la tecnología ARMS-PCR

El ensayo se *AmoyDx*® *KRAS Mutation Detection Kit* se ha diseñado para detectar 19 mutaciones somáticas en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del gen *KRAS* (Tabla 21). El ensayo *AmoyDx*® *NRAS Mutation Detection Kit* se ha diseñado para detectar las 16

Material y métodos

mutaciones somáticas en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del gen NRAS (Tabla 21). En general, esta aproximación es capaz de detectar mutaciones con un nivel de mutación mínimo del 1% cuando se utiliza 10 ng de muestra.

El kit contiene suficientes reactivos para procesar 8 muestras. La reacción de PCR se lleva a cabo en unas tiras o strips de 12 pocillos, precargadas con PCR Reaction Mix que contiene los reactivos necesarios para la detección de las mutaciones. *KRAS Enzyme Mix* y *NRAS Enzyme Mix* contienen la Taq DNA polimerasa para la amplificación por PCR y Uracil-N-glicosilasa para eliminar las cadenas de ADN que incluyan uracilo. Por último el kit también incluye un control positivo (*Positive Control*). Según el protocolo de análisis, la muestra de ADN debe prepararse a una concentración de 3 ng/ μ L y se le añade la enzima polimerasa. La mix es depositada en los pocillos de las tiras de reacción de PCR que contienen los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), las sondas específicas y el buffer necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación. El protocolo y programa de temperaturas que se han empleado se especifican en las tablas 22 y 23. La reacción de PCR a tiempo real se ha llevado a cabo en el *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Tabla 21: Mutaciones en *KRAS* y *NRAS* detectadas por el kit.

Gen	Exón	Mutación	Codificante
<i>KRAS</i>	2	G12S	34G>A
		G12D	35G>A
		G12C	34G>T
		G12R	34G>C
		G12V	35G>T
		G12A	35G>C
		G13C	37G>T
		G13D	38G>A
<i>KRAS</i>	3	A59T	175G>A
		Q61K	181C>A
		Q61L	182A>T
		Q61R	182A>G
		Q61H	183A>C
		Q61H	183A>T
<i>KRAS</i>	4	K117N	351A>C
		K117N	351A>T
		A146T	436G>A
		A146V	437C>T
		A146P	436G>C
<i>NRAS</i>	2	G12D	35G>A
		G12S	34G>A
		G13D	38G>A
		G13R	37G>C
		G12C	34G>T
		G12V	35G>T
		G12A	35G>C
		G13V	38G>T
		G12V	35G>T
		G12A	35G>C
G13V	38G>T		
<i>NRAS</i>	3	Q61R	182A>G
		Q61K	181C>A
		Q61L	182A>T
		Q61H	183A>C
		Q61H	183A>C
<i>NRAS</i>	4	A146T	436G>A

Material y métodos

Tabla 22: Protocolo empleado para la PCR en tiempo real empleando el *AmoyDx® KRAS/NRAS Mutations Detection Kit*.

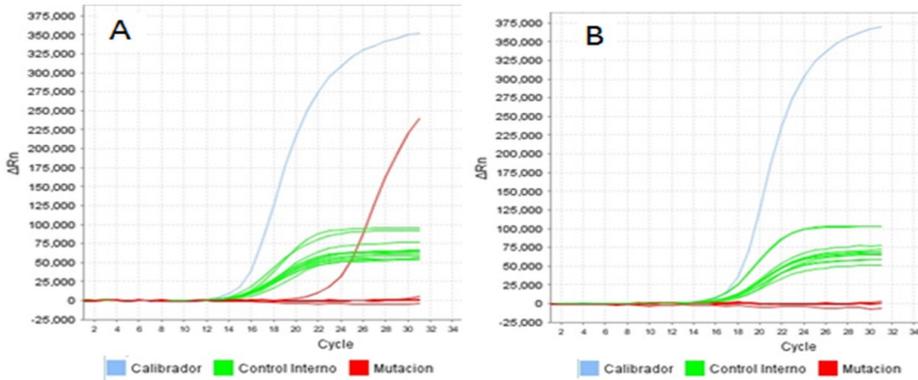
Reactivo	Volumen (µl)	
	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>
ADN (ng/µL)	65,8	42,3
Enzyme Mix	4,2	2,7

Tabla 23: Protocolo empleado para la PCR en tiempo real empleando el *AmoyDx® KRAS/NRAS Mutations Detection Kit*.

Nº Ciclos	Tª (°C)	Tiempo
1	95	5 m
15	95	25 s
	64	20 s
	72	20 s
31	93	25 s
	60	35 s
	72	20 s

S: Segundos; M: Minutos

El análisis de los datos se ha realizado en la plataforma *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) mediante la visualización de las curvas de amplificación (Figuras 26A y 26B).



Figuras 26Ay 26B: Imagen correspondiente a las curvas de amplificación mediante *AmoyDx® NRAS Mutations Detection Kit*. En la Figura 26A se observa la amplificación de una muestra portadora de mutación en el gen *NRAS*, mientras que en la Figura 26B no hay amplificación al ser una muestra *wt*.

2.3.2.2 Estudio de mutaciones mediante análisis de curvas de fusión de alta resolución

EL HRM es un método simple y rápido de cribado de variaciones genéticas que posee una elevada sensibilidad. Se lleva a cabo en un equipo de PCR en tiempo real y se basa en la comparación de las temperaturas de fusión (T^a *melting*; T_m). El procedimiento se inicia con una PCR para amplificar la región de interés, durante la cual se incluye un intercalante de nueva generación, el *Light cycler 480 ResoLight* (Roche), que emite fluorescencia cuando está unido a la doble cadena de ADN. A continuación, los amplicones generados se someten a un gradiente de temperaturas que producen en primer lugar la desnaturalización de la doble hebra, posteriormente la

Material y métodos

renaturalización y que termina de nuevo con la desnaturalización de fragmento amplificado. Todo el proceso se realiza en presencia del intercalante que permite detectar variaciones en la T_m de los fragmentos amplificados debidas a la diferente composición de nucleótidos por la presencia de mutaciones o polimorfismos.

Esta metodología se ha empleado para el estudio de mutaciones en el gen *IDHI* y la confirmación de las mutaciones identificadas mediante NGS en el gen *BRAF*. Todas las muestras han sido procesadas por duplicado y en cada experimento se ha incluido un control positivo (portador de la mutación p.Val600Glu en el caso de *BRAF*, y p.Arg132Cys en el caso de *IDHI*) y un control negativo (*wt*). En el caso de *IDHI* se ha procesado también un control portador del polimorfismo 105 GGC>GGT (*rs11554137*). El protocolo de trabajo y el programa de temperaturas se especifican en las tablas 24 y 25.

Tabla 24: Protocolo de trabajo empleado en la aproximación de HRM.

Reactivo	Volumen (μ l)
<i>LightCycler 480 High Resolution Melting Master Mix</i>	5
Cebadores	0,3
MgCl ₂ (25mM)	1,2
Agua libre de nucleasas	1,2
ADN (25 ng/ μ l)	2

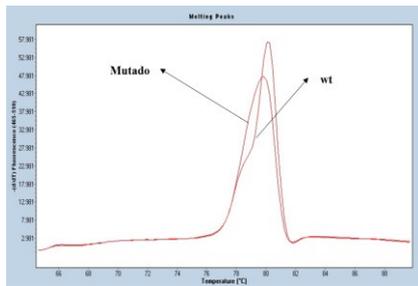
Tabla 25: Programa de temperaturas utilizado en la aproximación de HRM.

Etapa	Nº Ciclos	T ^a (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización	1	95	600
		95	10
Amplificación	50	56	13
		72	14
		95	60
Fusión	1	40	60
		60	1
		95	-
		40	10
Enfriamiento	1	40	10

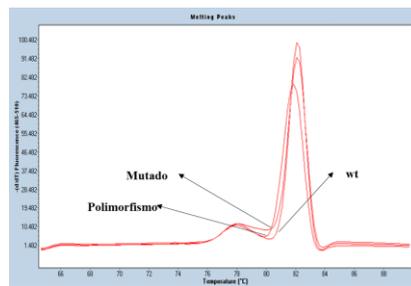
El análisis de los datos se ha realizado empleando el módulo *Tm Calling* incorporado en el programa LC 480 v.1.5. Este método de análisis permite la comparación de la T_m de cada una de las muestras con respecto a las muestras control, discriminando patrones (curvas de *melting*) distintos cuando existen alteraciones moleculares (Figura 27A y 27B). Todos los patrones anómalos diferentes del *wt* han sido clasificados como mutados, polimorfismos o dudosos. Los productos de PCR que generan patrones anómalos, han sido posteriormente analizados mediante secuenciación de Sanger para caracterizar la alteración molecular detectada.

Material y métodos

A



B



Figuras 27A y 27B: Estudio de mutaciones en los genes *BRAF* (A) e *IDH1* (B) mediante HRM. Imagen correspondiente a las curvas del *Tm Calling*. Se observan diferencias en la T_m de las muestras con mutación, polimorfismo y wt.

2.3.3 Estudio de mutaciones mediante secuenciación de Sanger

Para el estudio de las mutaciones en el promotor del gen *TERT*, así como para la confirmación de las mutaciones identificadas mediante *NGS* (genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, y *KRAS*) se ha empleado la secuenciación directa o secuenciación de Sanger. Adicionalmente, aquellas muestras que no han podido ser amplificadas mediante HRM para el estudio de mutaciones en el gen *IDH1*, también han sido estudiadas mediante secuenciación de Sanger.

La secuenciación de Sanger se basa en la polimerización del ADN mediante la incorporación aleatoria de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) marcados con fluoróforos. Estos ddNTPs terminan la elongación de la cadena al carecer del grupo 3'-OH produciendo fragmentos de longitud variable que posteriormente se separan por el tamaño mediante electroforesis capilar.

El estudio de mutaciones por este método requiere en un primer paso la amplificación de la región de interés por PCR. El protocolo de trabajo, el programa temperaturas de la PCR, y los cebadores empleados para la amplificación de cada gen se especifican en las tablas 26, 27 y 28.

Tabla 26: Protocolo de trabajo para la amplificación con el *Type-it Mutation Detect PCR kit*.

Reactivo	Volumen (µl)
<i>Type-it multiplex PCR Master Mix</i>	12,5
Q-Solution x5	2,5
Cebadores	0,5
Agua libre de nucleasas	7
ADN	2

Tabla 27: Programa de temperaturas para la amplificación con el *Type-it Mutation Detect PCR kit*.

Nº Ciclos	Paso	T ^a (°C)	Tiempo (minutos)
1	Desnaturalización inicial	95	5
	Desnaturalización	95	45
40	Hibridación	Ajustar	45
	Elongación	72	1
1	Elongación final	72	10

Los productos de PCR han sido testados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% permitiendo la visualización del fragmento amplificado en cada caso. Los productos de PCR han sido purificados con *ExoSAP-IT* (GE Healthcare), y preparados para su secuenciación utilizando *ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems). Los productos

Material y métodos

de secuenciación generados han sido posteriormente purificados empleando las columnas *Performa DTR Gel Filtration Cartridges* (EdgeBio). Finalmente la secuenciación se ha realizado en el ABIprism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para el análisis de los datos se ha utilizado el programa Sequencing Analyzer v.5.2.

Tabla 28: Parejas de cebadores empleados y temperaturas de hibridación correspondientes para la amplificación.

Gen	Exón	Cebadores	Tª hibridación (°C)
<i>TERT</i>	Promotor	F: CTCCCAGTGGATTCGCGGGC R: CCCACGTGCGCAGCAGGAC	63
<i>BRAF</i>	15	F: TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA R: GGCCAAAAATTTAATCAGTGG	59
<i>NRAS</i>	2	F: GGCCGATATTAATCCGGTGT R: TCCGACAAGTGAGAGACAGG	59
	3	F: TTGCATTCCCTGTGGFTTTT R: TGGTAACTCATTCCCCATA	59
<i>KRAS</i>	2	F: AGGCCTGCTGAAAAATGACTGAATA R: CTGTATCAAAGAATGGTCCCTGCAC	59
	3	F: CCAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGG R: AGAAAGCCCTCCCCAGTCTCA	59
	4	F: GACAAAAGTTGGACAGGT R: TAGCATAATTGAGAGAAAAACTG	59
<i>KIT</i>	11	F: GATGATTCTGACCTACAAAT R: ATTAAGCCACTGGAGTTCCTT	59
	17	F: TTCACTCTTACAAGTTAAAATG R: GAAACTAAAAATCCTTTGCTG	59
<i>IDHI</i>	4	F: CCATTTGTCTGAAAAACTTTGCT R: TCACATTATTGCCAACATGACTT	59

2.4 ESTUDIOS EPIGENÉTICOS

2.4.1 Detección de la metilación de promotores mediante amplificación múltiple empleando sonda dependiente de ligación sensible a metilación (MS-MLPA)

La presencia de metilación aberrante en la región promotora de genes supresores tumorales (TSGs; Tumor suppressor genes) se ha analizado mediante la amplificación múltiple o de sondas dependientes de ligación específica de metilación (MS-MLPA; Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification). El MLPA es un método basado en la PCR que permite analizar de forma simultánea las variaciones en el número de copias (VNCs) de múltiples genes, utilizando una única pareja de cebadores universales. Para ello, emplea dos hemisondas específicas de cada secuencia de ADN de interés, que contienen la mitad de la secuencia diana y la secuencia complementaria a los cebadores utilizados en la amplificación. Una vez que las dos hemisondas son hibridadas con secuencias inmediatamente adyacentes, se produce la ligación de ambas y la posterior amplificación por PCR. Los productos amplificados generan fragmentos de longitud variable que se separan mediante electroforesis capilar (Figura 28).

El MS-MLPA es una modificación del MLPA convencional que permite analizar las VNCs, así como los perfiles de metilación mediante dos reacciones en paralelo. En una de las reacciones se emplea la enzima endonucleasa HhaI que es sensible a metilación. Las sondas empleadas contienen un sitio de restricción de la enzima,

Material y métodos

que digiere aquellas secuencias en las que el ADN no se encuentra metilado. De esta forma, en la PCR posterior únicamente se amplifican las secuencias en las que existe metilación en la región de interés.

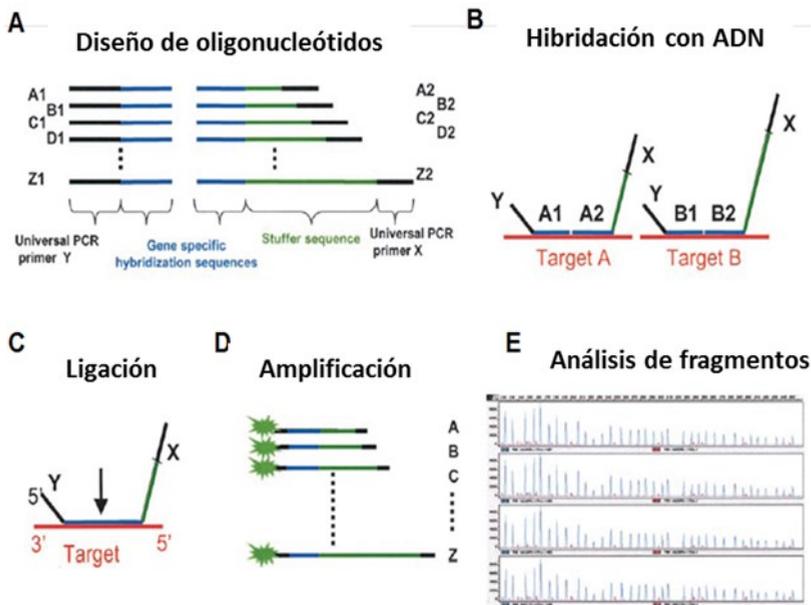


Figura 28: Etapas del método de MLPA: A) Diseño de los oligonucleótidos; B) Hibridación con el ADN diana; C) Ligación de los oligonucleótidos; D) Amplificación múltiple de las sondas formadas; E) Análisis de los fragmentos de PCR mediante electroforesis capilar.

El procedimiento MS-MLPA requiere seis etapas que incluyen: desnaturalización del ADN, hibridación de las sondas en la región de interés, ligación de las sondas, digestión con la enzima HhaI, reacción de PCR y separación de los productos amplificados por electroforesis capilar (Figura 29).

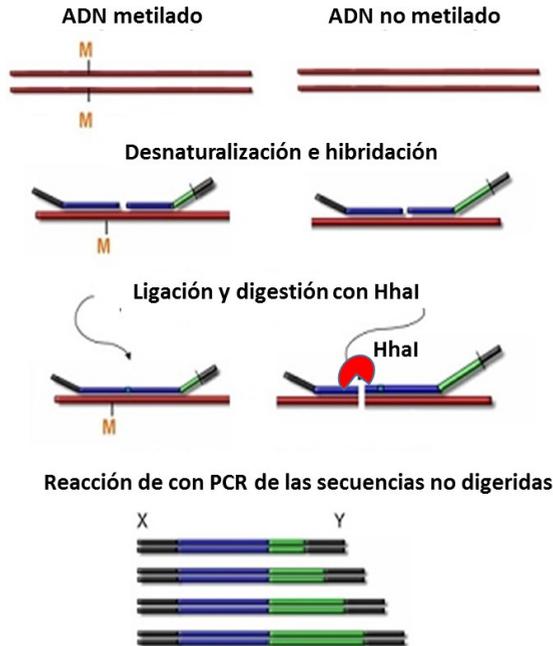


Figura 29: Diagrama de flujo para el estudio de metilación MS-MLPA.

El estudio de metilación aberrante en la región promotora de TSGs se ha realizado empleando la *SALSA ME001 MS-MLPA* (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) que contiene secuencias específicas que hibridan con las regiones promotoras de 24 TSGs (*TIMP3*, *APC*, *CDKN2A*, *MLH1*, *ATM*, *RARB*, *CDKN2B*, *HIC1*, *CHFR*, *BRCA1*, *CASP8*, *CDKN1B*, *PTEN*, *BRCA2*, *CD44*, *RASSF1*, *DAPK1*, *VHL*, *ESR1*, *TP73*, *FHIT*, *CADM1/IGSF4*, *CDH13* y *GSTP1*). En el Anexo 1 se especifican cada una de las sondas contenidas en el kit.

Para realizar el procedimiento se han seguido el protocolo y programas de temperaturas descritos por MRC-Holland (Tablas 29 y 30). Se requiere preparar las muestras de ADN a una concentración

Material y métodos

de 100 ng totales en un volumen de 5 μ L. Inicialmente se lleva a cabo la desnaturalización del ADN, y posteriormente se añade a cada muestra la sonda (*SALSA Probe-Mix*) para su hibridación. Tras una incubación de 16h, se llevan a cabo dos reacciones en paralelo dividiendo cada una de las muestras en dos alícuotas; en una alícuota se produce la ligación de las sondas mediante la adición de ligasa, y en la segunda alícuota además de la ligación de las sondas se lleva a cabo la digestión de las secuencias de ADN no metilado mediante la adición de enzima *HhaI*. A continuación, se amplifican las secuencias de ADN mediante la reacción de PCR en las dos alícuotas.

Tabla 29: Protocolo de trabajo seguido para el MS-MLPA.

Paso	Reactivo	Volumen (μ l)	
Hibridación			
	<i>Sonda (SALSA Probe-Mix)</i>	1,5	
	<i>MLPA Buffer</i>	1,5	
Ligación y digestión			
1°	<i>Ligase-65 buffer A</i>	3	
	Agua libre de nucleasas	10	
2°	1ª Alícuota	<i>Ligase-65 buffer B</i>	1,5
		<i>Ligase-65</i>	0,25
		Agua libre de nucleasas	8,5
	2ª Alícuota	<i>Ligase-65 buffer B</i>	1,5
		<i>Ligase-65</i>	0,25
		<i>Enzima HhaI</i>	0,5
	Agua libre de nucleasas	7,75	
Amplificación			
	<i>New PCR Primers Mix</i>	1	
	<i>Polymerase</i>	0,25	
	<i>Agua libre de nucleasas</i>	3,75	

L

Los productos de la amplificación se han separado mediante electroforesis capilar en el equipo *ABIprism 3130 Genetic Analyzer*

(Applied Biosystems). Para ello, se han empleado 3 μL del producto de PCR, 1 μL del marcador de pesos ROX 35-500, y 12 μL de formamida desionizada.

Tabla 30: Programa de temperaturas empleado para el MS-MLPA.

Paso	T ^a (°C)	Tiempo	
Desnaturalización			
	98	5m	
Hibridación			
1°	95	1m	
2°	60	16h	
Ligación y digestión			
1°	48	1m	
2°	48	30m	
3°	98	5m	
Amplificación			
Desnaturalización	x35	95	30
Hibridación		60	30
Elongación		72	1
Elongación final		72	20

Para el análisis de los resultados, los datos se han exportado al *software* Coffalyser (MRC Holland, The Netherlands), que permite realizar la interpretación del análisis de fragmentos y el análisis comparativo de la muestra problema y las dos muestras de referencia (Figura 30). Se han empleado como muestras de referencia ADN obtenido de muestras FFPE de piel sana. El *software* representa en el electroferograma únicamente las regiones de ADN en las existe metilación (son las únicas que se amplifican), así como las sondas control del kit, que no tienen secuencia de restricción de la enzima y

Material y métodos

por tanto son amplificadas siempre como control del experimento. La estimación del grado de metilación se calcula mediante el cociente ratio en la muestra digerida/ratio en la muestra sin digerir.

Adicionalmente, ha sido establecido el LoD de la aproximación MS-MLPA. Para ello, acorde a lo descrito anteriormente, se ha procesado una muestra de ADN completamente metilada (100%) en las islas CpG (*Universal Methylated Human DNA Standard*), especialmente diseñada como control de la eficiencia de los métodos de análisis de metilación. Se han realizado diluciones seriadas del ADN metilado control con ADN no metilado procedente de una muestra de sangre periférica de un control sano (previamente procesado y con ausencia de metilación en las sondas a estudio) en una proporción 1:1, 1:4, 1:9, 1:19 y 1:39, dando lugar a metilaciones del 50%, 20%, 10%, 5% y 2.5% del ADN, respectivamente. Cada una de las diluciones resultantes ha sido procesada por duplicado.

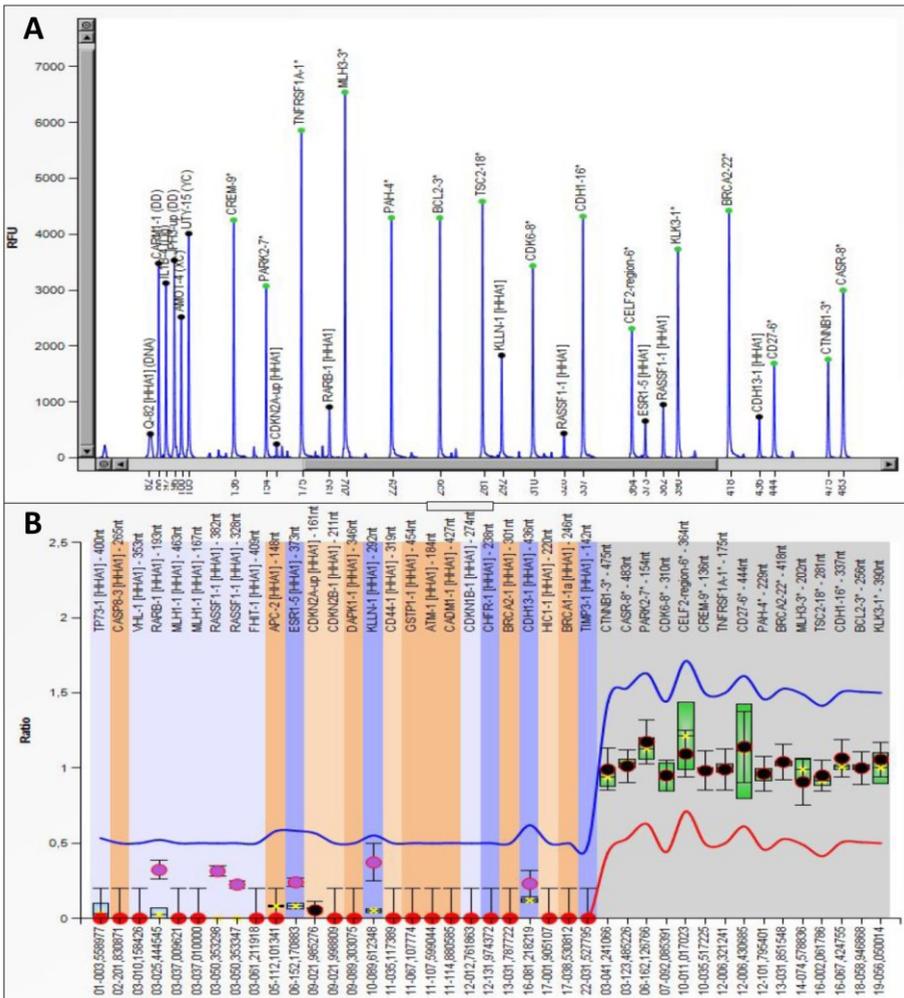


Figura 30: Análisis de los resultados de metilación mediante el *software* Coffalyser. A: Electroferograma en el que se observan los picos correspondientes a las sondas control (verde) y a las sondas amplificadas por la presencia de metilación. B: Estimación del ratio de metilación para cada una de las sondas y representación de las sondas control en la parte derecha (gris).

2.4.2 Expresión de miRNAS

La expresión de miRNAs se ha estudiado a partir de ARN extraído de muestras FFPE, y se ha llevado a cabo en dos fases. La primera fase se ha realizado en la Unidad de Genómica del IIS La Fe, donde se ha estudiado el perfil de expresión de miRNAs empleando *arrays* de expresión; la segunda fase se ha realizado en la Unidad de Biología Molecular y ha consistido en la validación de los resultados obtenidos en los *arrays* de expresión mediante el análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). El flujo de trabajo seguido está representado en la figura 31.

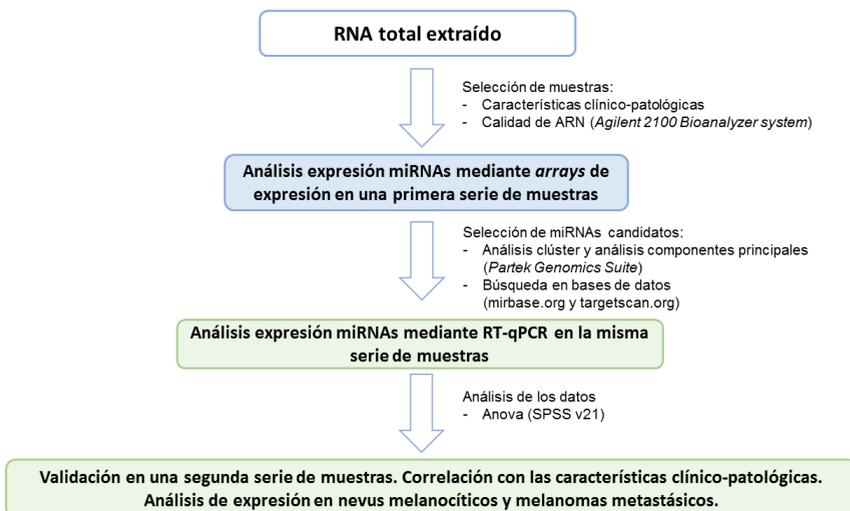


Figura 31: Diagrama de flujo seguido para el estudio de expresión de miRNAs. En azul se representa la primera fase y en verde la segunda fase de estudio.

2.4.2.1 Análisis de expresión de miRNAs mediante *arrays*. Selección de una firma epigenética

Para el análisis de expresión de miRNAs se han empleado los *arrays* de expresión *GeneChip miRNA 4.0* de Affymetrix. El contenido de sondas en humanos es de 2.578 miRNA y 2.025 pre-miRNA; y se basa en la versión 17 de la miRBase (www.mirbase.org).

Partiendo de 500 ng totales de RNA se lleva a cabo la poliadenilación que es la adición al extremo 3' del ARN mensajero de una cola poli-A. A continuación se realiza el marcaje con biotina empleando el *FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit* (Affymetrix). Posteriormente el ARN es hibridado en el *array GeneChip miRNA 4.0* de Affymetrix durante 16 h a 48°C y 60 rpms.

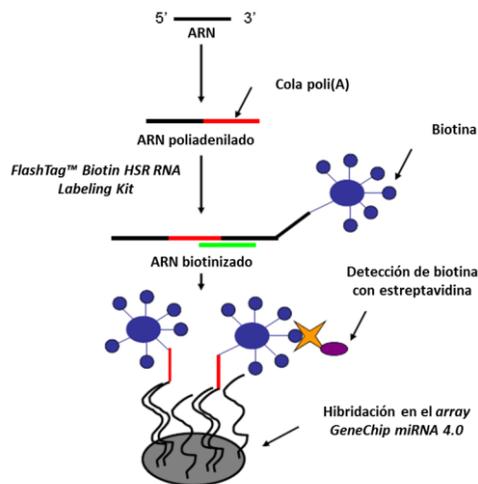


Figura 32: Diagrama de flujo utilizado para el análisis de expresión de miRs mediante *arrays* de expresión.

Material y métodos

Una vez finalizada la hibridación, se han obtenido los valores de expresión de miRNAs empleando el *GeneChip Scanner 3000 7G*. La normalización de los datos se ha realizado mediante el *Expression Console Software* (Affymetrix). El análisis de los datos normalizados se ha realizado con el *Partek Genomics Suite*, con el que se han llevado a cabo los análisis *cluster* y análisis de componentes principales (PCA) para cada una de las variables de estudio (estado mutacional del promotor del gen *TERT*, índice de Breslow, tasa de crecimiento, ulceración, mitosis y regresión histológica).

La selección de los miRNAs candidatos se ha basado en la expresión diferencial obtenida en base al análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el *Partek Genomics Suite*, así como en la búsqueda en bases de datos (www.mirbase.org y www.targetscan.org) y revisión de la literatura.

2.4.2.2 Estudio de la expresión de miRNAs mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Validación de la firma epigenética

Los estudios de expresión de los miRNAs seleccionados se han llevado a cabo en las muestras previamente procesadas por los *arrays* de expresión, así como en una segunda serie de muestras para su validación. Para ello, en un primer paso se ha obtenido ADNc a partir del ARN total extraído, y a continuación se ha realizado la cuantificación relativa de la expresión de miRNAs mediante RT-qPCR.

2.4.2.2.1 Transcripción reversa (RT)

Para la retrotranscripción de las muestras se ha empleado el kit *miScript II RT* (Qiagen) que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de la cadena molde de ARN mediante la utilización de la enzima transcriptasa reversa. Se requieren 500 ng totales de RNA de partida para obtener un volumen final de 20 µl de ADNc que será empleado en las posteriores amplificaciones por PCR. El protocolo de trabajo y el programa de temperaturas se especifican en las tablas 31 y 32. El ADNc obtenido se ha diluido a una proporción 1/10 para la realización de la RT-qPCR.

Tabla 31: Protocolo de trabajo de la RT.

Reactivo	Volumen (µl)
5x <i>miScript HiFlex Buffer</i>	4
10x <i>miScript Nucleics Buffer</i>	2
<i>miScript RT mix</i>	2
Inhibidor de RNAsas	0,4
ARN (500ng)	11,6

Tabla 32: Programa de temperaturas empleado para la RT.

T ^a (°C)	Tiempo (minutos)
37	60
95	5

Material y métodos

2.4.2.2.2 Cuantificación relativa de la expresión de miRNAs mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La RT-qPCR es una variación de la PCR estándar que se emplea como método de cuantificación relativa de la expresión de ARNm (ARN mensajero) o miRNAs. Para ello, se emplean sondas específicas o agentes intercalantes que se unen a la secuencia de estudio y emiten fluorescencia a medida que se amplifica el producto de PCR.

La estimación de la expresión génica se basa en el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak *et al.*, 2001), basado en comparar los valores del ciclo umbral (Ct) del gen control con los genes a estudio. El Ct que es el ciclo a partir del cual comienza a detectarse el producto de PCR mediante fluorescencia. Por tanto, para evaluar la expresión se calcula el ΔCt , que es la diferencia en el valor de Ct del gen de estudio con el gen de referencia ($\Delta Ct = Ct \text{ gen a estudio} - Ct \text{ gen de referencia}$). Adicionalmente, se obtiene el valor $\Delta\Delta Ct$, que compara los valores de ΔCt de la muestra problema con una muestra control ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra control}$).

La cuantificación de la expresión de miRNAs se ha realizado mediante *SYBR Green* en la plataforma *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems*, empleando cebadores específicos para cada uno de los miRNAs seleccionados (Tabla 33). Como gen de referencia para normalizar los valores de expresión se ha seleccionado un gen sin variaciones significativas en los valores de fluorescencia obtenidos en

los *arrays* (miRNA SNORD95). Todas las reacciones se han llevado a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos. Como muestra control se ha empleado un pool de ARNs obtenidos de piel sana. En las tablas 34 y 35 se especifican el protocolo y el programa de temperaturas empleados.

Tabla 33: Secuencias de los cebadores utilizados para el estudio de de los miRNAs candidatos mediante RT-qPCR.

miScript Primer Assay	Secuencia microRNA maduro	Longitud (pb)
Hs_miR-30b_1 miScript Primer Assay	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	22
Hs_miR-34a_1 miScript Primer Assay	UGGCAGUGUCUUAUCUGGUUGU	22
Hs_miR-130b_1 miScript Primer Assay	CAGUGCAAUGAUGAAAGGCAU	22
Hs_miR-138_1 miScript Primer Assay	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	23
Hs_miR-197_2 miScript Primer Assay	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	22
Hs_miR-339_1 miScript Primer Assay	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	23
Hs_miR-500a_1 miScript Primer Assay	UAAUCCUUGCUACCUGGGUGAGA	23
Hs_miR-885-3p_1 miScript Primer Assay	AGGCAGCGGGUGUAGUGGAUA	22
Hs_SNORD95_11 miScript Primer Assay	GCGGTGATGACCCCAACATGCCATCTGAGTGTC GGTGCTGAAATCCAAGGCTGTTCTGAGC	63

Tabla 34: Protocolo de trabajo de la RT-qPCR utilizada para la cuantificación relativa de la expresión de miRNAs.

Reactivo	Volumen (µl)
<i>SYBR green PCR master mix</i>	10
10x Universal Primer	2
10x Primer Assay	2
Agua libre de nucleasas	4
ADN	2

Tabla 35: Programa de temperaturas de la RT-qPCR utilizada para la cuantificación relativa de la expresión de miRNAs.

Nº Ciclos	T ^a (°C)	Tiempo (minutos)
1	95	10m
40	95	15s
	60	60s

S: Segundos; M: Minutos

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis descriptivo de las variables cuantitativas continuas se ha realizado empleando la media, la mediana, la desviación típica y el intervalo. Las variables categóricas se han resumido mediante frecuencias absolutas y relativas.

El análisis inferencial de las variables cuantitativas se ha llevado a cabo con el ANOVA de un factor. La asociación entre variables cualitativas se ha realizado mediante la prueba χ^2 . En análisis multivariante se ha realizado mediante regresión logística binaria.

La SLE y la SG se han calculado mediante el método de Kaplan-Meier. El análisis univariante y multivariante de supervivencia se ha realizado mediante las pruebas log-rank, y el método del riesgo proporcional de Cox.

Todo el análisis de los datos se ha realizado con el paquete estadístico SPSS (versión 21). En todos los casos se ha considerado significación estadística $p < 0.05$. Las gráficas se han realizado mediante la aplicación Microsoft Excel, el paquete SPSS, el programa *GraphPad Prism* y el *software* estadístico R.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS GENÉTICOS

1.1. ESTUDIO DE ALTERACIONES MOLECULARES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA

1.1.1. Selección de genes y diseño del panel

Se seleccionaron un total de 35 genes para su estudio mediante secuenciación masiva; en 30 de ellos se seleccionaron regiones exónicas específicas o “*hot spots*” donde previamente se habían descrito mutaciones y en los cinco restantes se incluyó toda la región codificante. El panel incluyó un total de 515 amplicones, 23.702 pares de bases y una cobertura global del 97,76%. En la tabla 36 se recogen los genes estudiados mediante NGS, la cobertura de cada uno, así como el número de amplicones con los pares de bases que los cubren y el porcentaje de secuencia cubierta. En el anexo 2 se especifican las posiciones cromosómicas de cada uno de los amplicones incluidos en el diseño.

El promotor del gen *TERT* no pudo ser incluido en el panel debido a la baja cobertura de lectura que generaba el diseño. Únicamente se incluyeron regiones codificantes del gen *TERT* donde se localizan mutaciones previamente reportadas. Por el mismo motivo, tampoco fueron incluidas todas las regiones codificantes de interés del gen *CDKN2A*.

Resultados

Tabla 36: Panel de genes diseñado para el abordaje molecular del melanoma mediante NGS.

Gen	NM	Locus	Pares de bases	Amplicones	Cobertura
<i>NRAS</i>	NM_002524.4	1p13.2	170	3	100
<i>ERBB4</i>	NM_005235.2	2q33.3-q34	4207	64	99,6
<i>HOXD8</i>	NM_001199747	2q31.1	25	1	100
<i>ALK</i>	NM_004304.4	2p23	200	16	100
<i>MITF</i>	NM_198159.2	3p14.2-p14.1	71	6	100
<i>BAP1</i>	NM_004656.3	3p21.31-p21.2	41	3	100
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.2	3q26.3	127	8	100
<i>KIT</i>	NM_000222.2	4q12	208	12	100
<i>TERT</i>	NM_198253.2	5p15.33	20	1	99
<i>EPHA7</i>	NM_004440.3	6q16.1	130	12	100
<i>STK19</i>	NM_032454.1	6p21.3	20	2	100
<i>BRAF</i>	NM_004333.4	7q34	199	5	100
<i>MET</i>	NM_001127500.1	7q31	4427	59	99,3
<i>GRM3</i>	NM_000840.2	7q21.1-q21.2	495	16	100
<i>RAC1</i>	NM_018890.3	7p22	20	2	100
<i>STK31</i>	NM_031414.4	7p15.3	281	20	100
<i>TRAPP</i>	NM_001244580.1	7q21.2-q22.1	150	14	100
<i>PREX2</i>	NM_024870.2	8q13.2	5456	85	95,07
<i>CDKN2A</i>	NM_058195	9p21	10	1	100
<i>GNAQ</i>	NM_002072.4	9q21	41	3	100
<i>TAF1L</i>	NM_153809.2	9p21.1	141	11	100
<i>PPP6C</i>	NM_002721.4	9q33.3	110	6	100
<i>PTEN</i>	NM_000314.4	10q23.3	1302	18	93,93
<i>HRAS</i>	NM_001130442.1	11p15.5	21	2	100
<i>KRAS</i>	NM_033360.3	12p12.1	50	4	100
<i>CDK4</i>	NM_000075.3	12q14	10	1	100
<i>MAP2K1</i>	NM_002755.3	5q22.1-q22.33	162	7	100
<i>MC1R</i>	NM_002386.3	16q24.3	110	5	94
<i>GRIN2A</i>	NM_001134407.1	16p13.2	4515	51	97,2
<i>ADAMTS18</i>	NM_199355.2	16q23	310	21	100
<i>NF1</i>	NM_001042492.2	17q11.2	431	37	100
<i>GNAI1</i>	NM_002067.4	19p13.3	20	2	100
<i>MAP2K2</i>	NM_030662.3	19p13.3	50	4	100
<i>STK11</i>	NM_000455.4	19p13.3	100	8	100
<i>IRS4</i>	NM_003604.2	Xq22.3	72	5	100

1.1.2. Métricas de calidad del panel y estudio de sensibilidad

El análisis de un total de 130 muestras FFPE (118 melanomas primarios y 12 melanomas metastásicos) mediante secuenciación masiva nos permitió establecer las métricas de calidad del panel diseñado. El análisis de cobertura demostró una media de lecturas totales de 1.301.956,5 y una media de lecturas por amplicón de 2.298,7. El 98,7% de las bases mostraron una cobertura $\geq 100x$ y el 92,8% $\geq 500x$. La uniformidad media de las lecturas fue del 91,8% (Figura 33).

El estudio de sensibilidad analítica realizado mediante diluciones seriadas de ADN de dos líneas celulares determinó un LoD a una frecuencia alélica del 0,5%. La metodología fue capaz de detectar la mutación p.Val600Glu del gen *BRAF*, así como el polimorfismo p.Arg160Trp en el gen *MC1R* en todas las diluciones realizadas (Tabla 37). Sin embargo, mediante la visualización de la mutación p.Val600Glu del gen *BRAF* en el *software* IGV se detectó que con la dilución al 0,05% la lectura de falsos positivos (lectura de una G en lugar de una A) era superior a la lectura de verdaderos positivos (lectura de una T en lugar de una A). Dada la lectura de falsos positivos con la dilución al 0,05%, el LoD de la metodología se estableció en la dilución previa (0,5%; 1:99), ya que a esta frecuencia alélica no se detectaron falsos positivos (Figura 34).

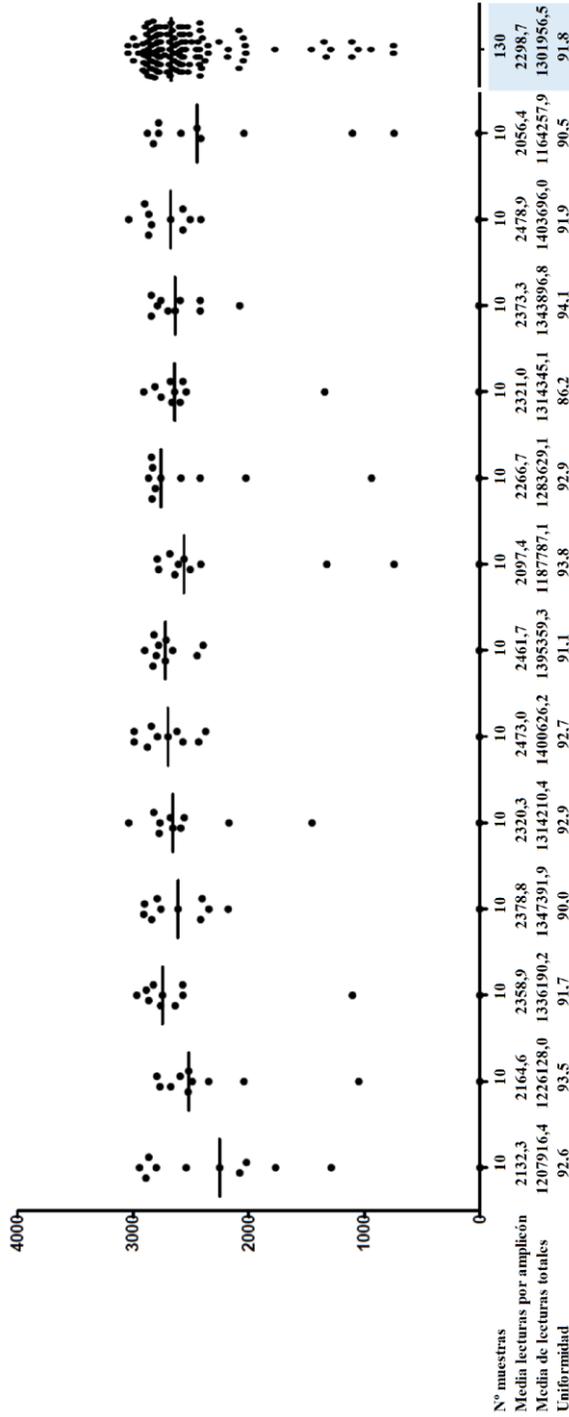


Figura 33: Representación gráfica de las métricas de calidad obtenidas en la secuenciación de las 130 muestras de melanoma FFPE.

Tabla 37: Resultados de secuenciación masiva de las diluciones seriadas de ADN de ambas líneas celulares en dos experimentos independientes.

Dilución HT-29 con Caco-2 (FA esperada)	<i>BRAF</i> , p.Val600Glu (heterocigosis)				<i>MClR</i> , p.Arg160Trp (heterocigosis)			
	FA identificada (%)		Cobertura (x)		FA identificada (%)		Cobertura (x)	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
Sin diluir (50%)	57,12	52,85	2027	2182	61,42	64,48	1894	2329
1:1 (25%)	26,22	25,69	4366	5780	32,66	32,93	2103	2708
1:3 (12.5%)	13,13	12,85	5620	3507	14,84	15,53	2182	2524
1:24 (2%)	1,82	1,75	3720	5323	1,95	1,21	1894	1981
1:49 (1%)	1,12	0,81	4266	3297	0,8	0,87	2967	2631
1:99 (0.5%)	0,65	0,64	3799	3430	0,57	0,34	2624	1458
1:999 (0.05%)	0,04	0,1	4993	2995	0,03	0,19	3065	3138

FA: Frecuencia alélica; Exp: Experimento

1.1.3. Clasificación y confirmación de las variantes identificadas

1.1.3.1 Clasificación de las variantes identificadas

Tras aplicar los programas de predicción *in silico* (SIFT, Polyphen-2, Provean, CONDEL y SNPS&GO), 165 de las 294 variantes diferentes identificadas en los 35 genes estudiados (165/294; 56%), fueron clasificadas como patogénicas. Todas las variantes con predicción patogénica se recogen en el anexo 3. La mediana de variantes totales identificadas por muestra fue de 9 (rango de 2 a 36), y la mediana de variantes patogénicas de 2 (rango de 0 a 19). En el 90% (106/118) de las muestras se identificó al menos una variante patogénica en alguno de los genes estudiados. En el 35% (41/118) de las muestras se identificaron tres o más genes con variantes patogénicas. En el 59% (70/118) de las muestras se identificaron variantes patogénicas concurrentes en varios genes. Las variantes patogénicas vienen referidas como mutaciones en los apartados siguientes. En el caso de los genes en los que las alteraciones se han

Resultados

descrito en línea germinal (*MC1R*, *MITF*, *CDKN2A* y *CDK4*), las variantes vienen referidas como polimorfismos.

1.1.3.2 Confirmación de las variantes identificadas

La confirmación de las mutaciones identificadas mediante NGS se llevó a cabo en la UBM mediante métodos moleculares empleados en la rutina asistencial. Las mutaciones identificadas en los genes *BRAF*, *NRAS*, *KRAS* y *KIT* en melanomas primarios y metastásicos fueron confirmadas en el 75% (87/115) de las muestras.

Mediante HRM y secuenciación Sanger se confirmaron el 65% (51/78) de las mutaciones detectadas en el gen *BRAF*. Todas las mutaciones identificadas en los genes *NRAS* (100%; 28/28) y *KRAS* (100%; 4/4) fueron confirmadas mediante PCR en tiempo real y secuenciación Sanger. Las mutaciones en el gen *KIT* se confirmaron mediante secuenciación Sanger en el 80% (4/5) de los melanomas.

Un 24% (28/115) de las mutaciones no pudieron ser confirmadas por otros métodos debido a la menor sensibilidad de las técnicas empleadas en comparación con la NGS (media de frecuencia alélica del 5,3%, media de lecturas del alelo mutado de 219,8).

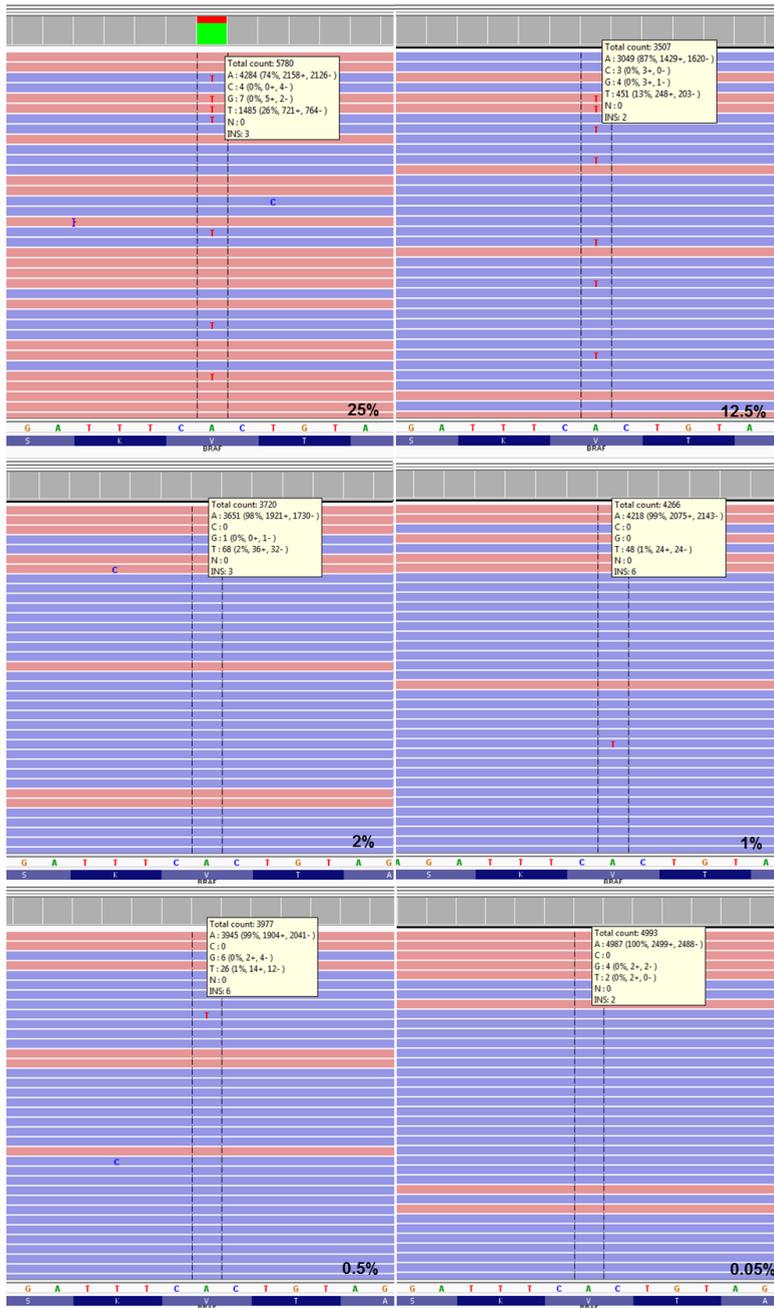


Figura 34: Visualización de la mutación p.Val600Glu en el gen *BRAF* mediante el *software* IGV. En el recuadro amarillo se especifica el número total de lecturas y número de lecturas de cada nucleótido (A, C, G, T) para esa posición cromosómica.

Resultados

1.2. PREVALENCIA DE ALTERACIONES MOLECULARES EN MELANOMAS PRIMARIOS

Se detectaron mutaciones en el 86% (30/35) de los genes incluidos en el panel (Figura 35). Asimismo, en el 90% (106/118) de las muestras se identificó al menos una mutación, y en el 61% (72/118) se detectaron ≥ 2 mutaciones.

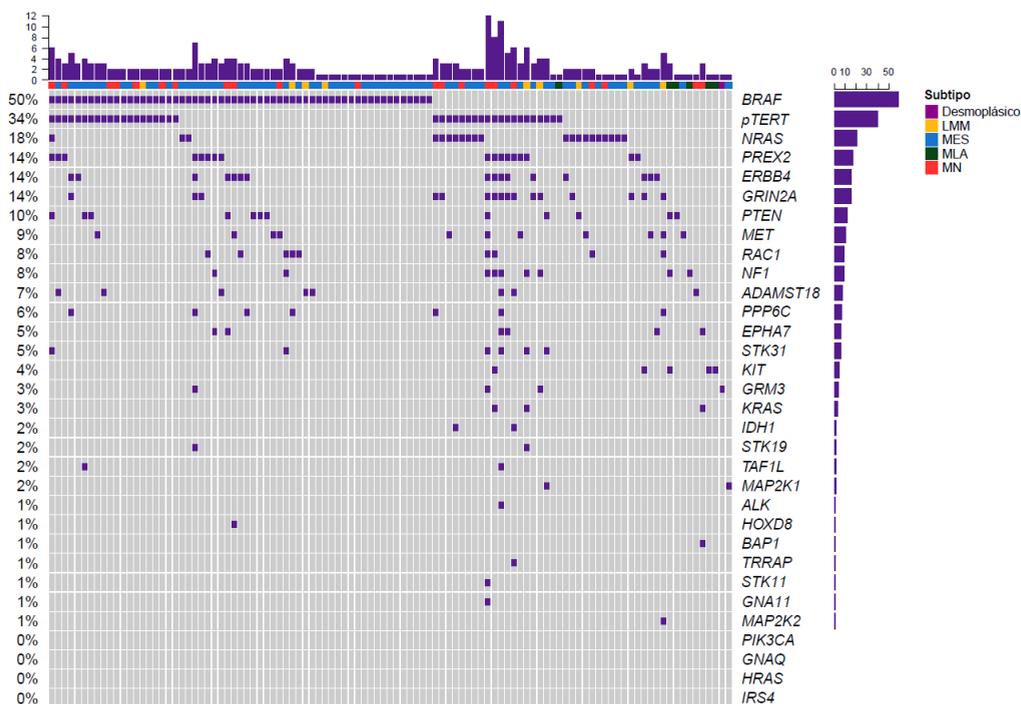


Figura 35: Prevalencia de mutaciones en los genes estudiados. Cada columna representa una muestra con mutación ($n=106$) y cada fila un gen ($n=32$). Han sido excluidos los genes con variantes en línea germinal. En la barra superior está representado el nº total de genes con mutaciones por muestra y el subtipo histológico de cada melanoma. La columna de la izquierda representa la prevalencia de mutaciones detectada para cada uno de los genes incluidos en el panel de NGS. Adicionalmente, se ha incluido la prevalencia de mutaciones en el promotor del gen

TERT (analizadas mediante secuenciación Sanger) en la serie de 118 melanomas estudiada por NGS (34%; 40/118).

1.2.1. Prevalencia de mutaciones en genes clásicos del melanoma

Respecto a los genes estudiados pertenecientes a la vía de la MAP-quinasas, el gen con mayor prevalencia de mutaciones fue *BRAF* (59/118; 50%). La mutación más frecuentemente identificada fue la p.Val600Glu (47/59; 79%), seguida de la p.Val600Lys (5/59; 8%), la p.Lys601Glu (3/59; 5%), y seguida de otras menos frecuentes (1/59; 2%) como la p.Leu597Arg, p.Leu584Phe, p.Gly464Arg, y la p.Pro731Ser (Figura 36).

El gen *NRAS* presentó la segunda mayor frecuencia mutacional (21/118; 18%). La mayoría de las mutaciones en *NRAS* se localizaron en el codón 61 (19/21; 91%), siendo la más frecuente la mutación p.Gln61Lys (9/21; 43%), seguida de p.Gln61Arg (8/21; 38%), p.Gln61Leu (2/21; 9%), p.Glu62Gln (1/21; 5%) y p.Gly12Ser (1/21; 5%) (Figura 37). En un 3% (3/118) de las muestras se detectaron mutaciones en el gen *KRAS*, siendo la más frecuente la p.Gln61Arg (2/3; 75%). Ninguna muestra fue portadora de mutaciones en el gen *HRAS*.

Por otro lado, las mutaciones en el gen *KIT* se identificaron en un 4% (5/118) de los melanomas, con una mutación recurrente (p.Leu576Pro) en dos de las muestras (Figura 38).

Resultados

Un 10% (12/118) de las muestras resultaron portadoras de mutaciones en el gen *PTEN*, con una mutación recurrente (p.Phe278Leu) en dos de ellas. No se identificaron mutaciones en el gen *PIK3CA* ni en *IRS4* en ninguno de los melanomas.

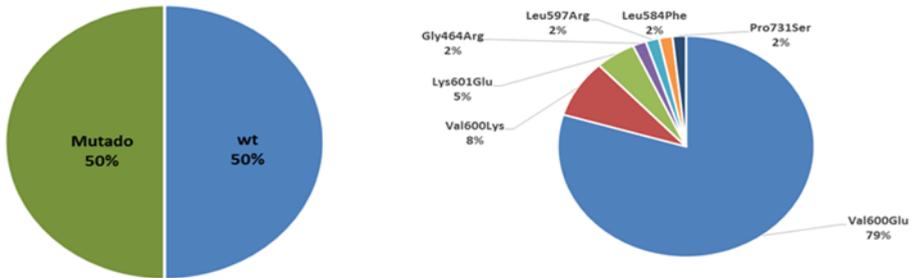


Figura 36: Prevalencia y espectro mutacional del gen *BRAF*.

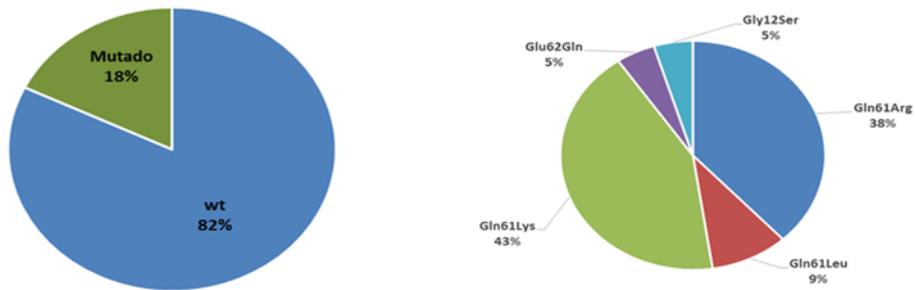


Figura 37: Prevalencia y espectro mutacional del gen *NRAS*.

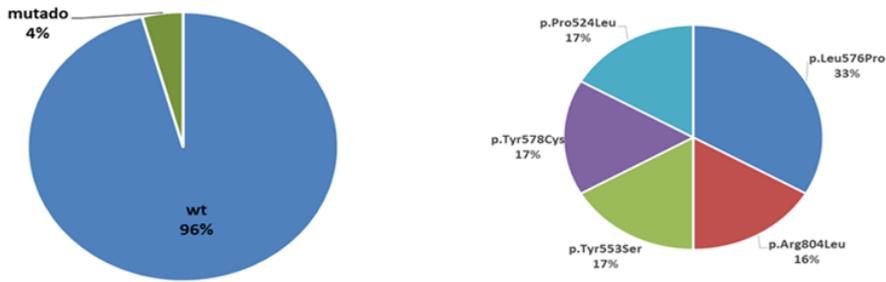


Figura 38: Prevalencia y espectro mutacional del gen *KIT*.

1.2.2. Prevalencia de mutaciones en nuevos oncogenes y genes supresores tumorales

No se identificaron mutaciones en la región codificante del gen *TERT* en los 118 melanomas estudiados mediante NGS. Sin embargo, el promotor del gen *TERT*, estudiado en 201 melanomas primarios mediante secuenciación Sanger, resultó mutado en el 30% (60/201) de las muestras (Figura 39). Las mutaciones más frecuentes fueron las localizadas en las posiciones c.1-146C>T (57%; 34/60) y c.1-124C>T (28%; 17/60). Otras mutaciones identificadas con menor frecuencia fueron las localizadas en las posiciones c.1-124/-125CC>TT (5%; 3/60), c.1-138/-139 CC>TT (8%; 5/60) y c.1-57 A>C (2%; 1/60). Adicionalmente, en el promotor del gen *TERT* se valoró el polimorfismo *rs2853669* (c.1-245 TT>CC) en 131 muestras, de las cuales 40,5% (53/131) fueron portadoras del mismo [19% (10/53) en homocigosis, y 81% (43/53) en heterocigosis].

Resultados

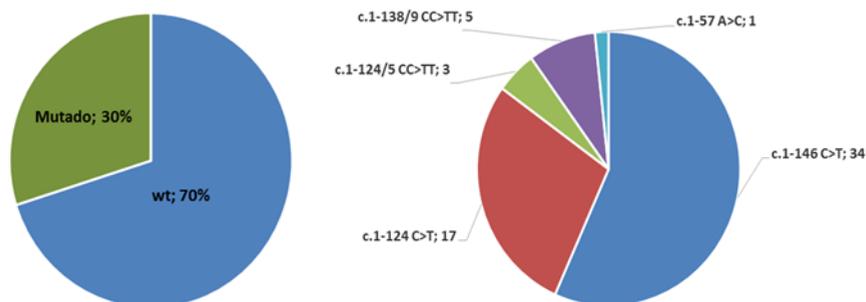


Figura 39: Frecuencia y espectro mutacional del promotor del gen *TERT*.

Otros genes con alta tasa de mutaciones fueron *ERBB4*, *PREX2* y *GRIN2A*, en los que se identificó una prevalencia del 14% (16/118) en cada uno de ellos, con mutaciones distribuidas a lo largo de todo el gen. En caso de *ERBB4* se detectaron tres mutaciones recurrentes, la p.Glu452Lys, la p.Arg106Cys y p.Arg525Pro. Tres melanomas presentaron la mutación p.Asp312Asn y dos la mutación Glu222Lys en el gen *PREX2*; dos melanomas eran portadores de la mutación p.Ser245Phe y dos de la mutación p.Arg681Gln en el gen *GRIN2A*. Con respecto al gen *NFI*, nueve melanomas (8%) eran portadores de mutaciones, y en dos de ellos se detectó la mutación p.Arg1362Ter. Un 8% (9/118) de las muestras era portador de mutaciones en el gen *RAC1*, localizándose el 90% (8/9) en el *hot spot* p.Pro29Ser. Con respecto al gen *PPP6C*, siete melanomas (6%) presentaron mutaciones, de los cuales cuatro (57%) eran portadores de la mutación p.Arg264Cys. En cuanto al gen *IDH1*, estudiado en un total de 207 melanomas primarios, sólo dos melanomas (1%) eran portadores de la mutación p.Arg132Cys. De forma adicional, se identificó el polimorfismo *rs11554137* (codón 105 GGC>GGT) en el 15,5% (32/207) de los melanomas.

1.2.3. Prevalencia de alteraciones moleculares en genes asociados al melanoma familiar

En un 69% (81/118) de los pacientes se detectaron polimorfismos en el gen *MC1R*, siendo los más frecuentes p.Val60Leu (36%; 38/104), p.Val92Met (21%; 22/104), y p.Asp294His (8%; 9/104) (Figura 40). Todos los polimorfismos identificados fueron clasificados como polimorfismos de alto riesgo excepto p.Val60Leu, p.Val92Met y p.Arg163Gln. En cuatro pacientes (3%) se detectaron polimorfismos en el gen *CDK4*, todos ellos afectando al aminoácido arginina de la posición 24 (p.Arg24His y p.Arg24Cys). De forma adicional, dos pacientes fueron portadores del polimorfismo p.Glu318Lys en el gen *MITF*. Sólo en un paciente se identificó el polimorfismo p.Pro48Leu en el gen *CDKN2A*.

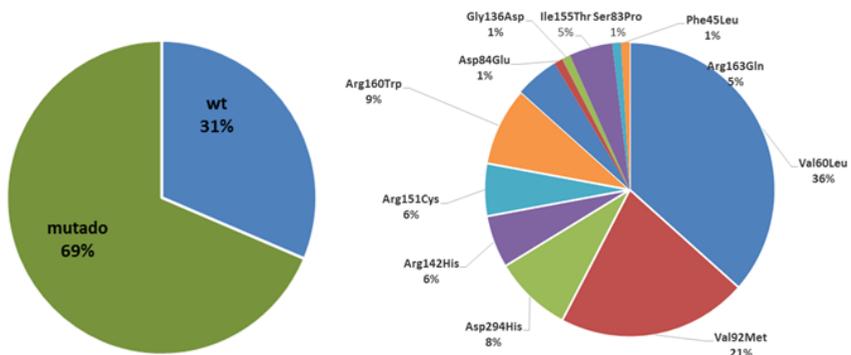


Figura 40: Prevalencia y espectro de los polimorfismos del gen *MC1R*.

Resultados

1.2.4. Mutaciones concurrentes en los melanomas primarios

Más de la mitad de los melanomas (59%; 70/118) presentaron mutaciones concurrentes en varios genes (Figura 41). Las mutaciones en el gen *BRAF* coexistieron con frecuencia con las mutaciones en el promotor del gen *TERT* (50%20/40), con *PREX2* (47%; 8/17) y *RAC1* (55,5%; 5/9). También resultó frecuente la concurrencia de mutaciones en los genes *NRAS* y el promotor del gen *TERT* (22,5%; 9/40). Las mutaciones en el gen *PTEN* se asociaron sobre todo a las mutaciones en el gen *BRAF* (58%; 7/12), y con menor frecuencia al gen *NRAS* (17%; 2/12). En el 97,5% de las muestras las mutaciones en los genes *BRAF* y *NRAS* fueron mutuamente excluyentes; sin embargo se detectaron mutaciones concurrentes en tres de las muestras, dos de ellas fuera de la posición 600 (p.Leu597Arg y p.Gly12Ser; p.Leu584Phe y p.Gln61Leu) y sólo una en el “hot spot” V600 (p.Val600Glu y p.Gln61Arg) (Tabla 38). Adicionalmente, se identificaron dobles mutaciones en los genes *BRAF* (p.Lys601Glu y p.Pro731Ser), *NRAS* (p.Gln61Arg y p.Glu62Gln), *KRAS* (p. Gln61Arg y p.Ala146Val) y *KIT* (p.Tyr553Ser y p.Tyr578Cys). A su vez, la misma muestra que presentó doble mutación en *KRAS*, también fue portadora de una mutación en el gen *KIT* (p.Pro524Leu).

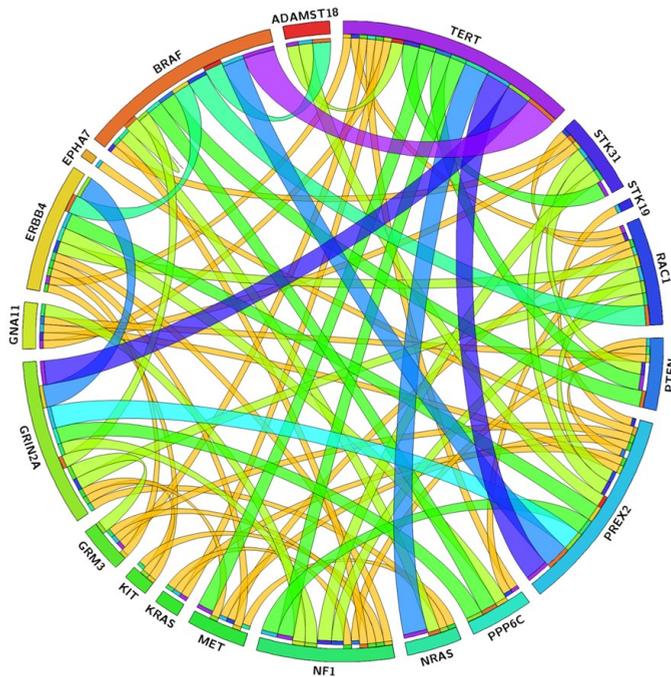


Figura 41: Diagrama de circos que muestra la concurrencia mutacional detectada en los melanomas de nuestra serie (n=118)

Resultados

Tabla 38: Mutaciones concurrentes identificadas en los genes *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *KIT* y *NFI*.

No.	Gen	Mutación	Frecuencia alélica (%)
2	<i>BRAF</i>	Gly464Arg	6,8
	<i>NFI</i>	Arg711Cys	4,7
28	<i>NRAS</i>	Glu62Gln	8,0
	<i>NRAS</i>	Gln61Arg	8,0
58	<i>BRAF</i>	Leu597Arg	4,1
	<i>NRAS</i>	Gly12Ser	5,0
62	<i>KRAS</i>	Gly12Val	61,1
	<i>NFI</i>	Trp1512*	30,8
68	<i>BRAF</i>	Val600Glu	25,4
	<i>NFI</i>	Lys1844Th	6,3
71	<i>KIT</i>	Tyr553Ser	31,8
	<i>KIT</i>	Tyr578Cys	43,9
80	<i>BRAF</i>	Val600Glu	2,0
	<i>NRAS</i>	Gln61Arg	3,0
84	<i>BRAF</i>	Leu584Phe	23,1
	<i>NRAS</i>	Gln61Leu	24,0
107	<i>KRAS</i>	Gln61Arg	5,3
	<i>KRAS</i>	Ala146Val	10,6
	<i>KIT</i>	Pro524Leu	22,8
	<i>NFI</i>	Gln1070Ter	13,5
151	<i>BRAF</i>	Lys601Glu	15,0
	<i>BRAF</i>	Pro731Ser	18,3

1.3. ASOCIACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES CON LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

El número de mutaciones detectadas varió en función de la localización anatómica, con una reducción significativa en los melanomas de localización acral ($p=0,004$) (Figura 42).

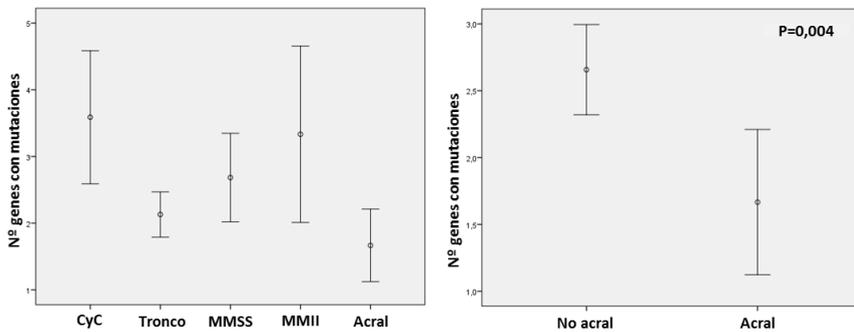


Figura 42: Variación en el número de genes mutados en función de la localización anatómica.

La prevalencia mutacional de los genes estudiados difirió significativamente en función de la localización anatómica del melanoma. Así, las mutaciones en el gen *KIT* se asociaron a melanomas en áreas no fotoexpuestas ($p=0,030$), concretamente a melanomas con localización acral ($p<0,001$) (Figura 43; Tabla 39); mientras que las mutaciones en los genes *GRIN2A*, *RAC1* y *NF1* fueron más frecuentes en melanomas localizados en áreas fotoexpuestas ($p=0,002$, $p=0,013$, $p=0,001$, respectivamente). También existieron diferencias en cuanto al subtipo histológico, siendo más frecuentes las mutaciones en el gen *TERT* en los MN

Resultados

($p=0,004$), mientras que los MLA fueron portadores con mayor frecuencia de mutaciones en el gen *KIT* ($p<0,001$). Los melanomas con mayor índice de Breslow se asociaron a las mutaciones en el gen *TERT* ($p<0,001$), así como a mutaciones en los genes *KIT* y *NF1* ($p=0,025$, $p=0,034$ respectivamente). Asimismo, los melanomas ulcerados presentaron con frecuencia mutaciones en los genes *TERT*, *KIT*, *PREX2* y *NF1* ($p=0,003$, $p=0,025$, $p=0,004$ y $p<0,001$, respectivamente), mientras que en los melanomas con mitosis se detectó mayor frecuencia de mutaciones en los genes *TERT* y *GRIN2A* ($p<0,001$ y $p=0,012$, respectivamente). De forma adicional, las mutaciones en el promotor de *TERT* se asociaron a los melanomas sin regresión histológica ($p=0,045$). A su vez, las mutaciones en los genes *TERT*, *RAC1* y *NF1* se identificaron con mayor frecuencia en los FGM ($p<0,001$, $p=0,035$ y $p=0,007$, respectivamente).

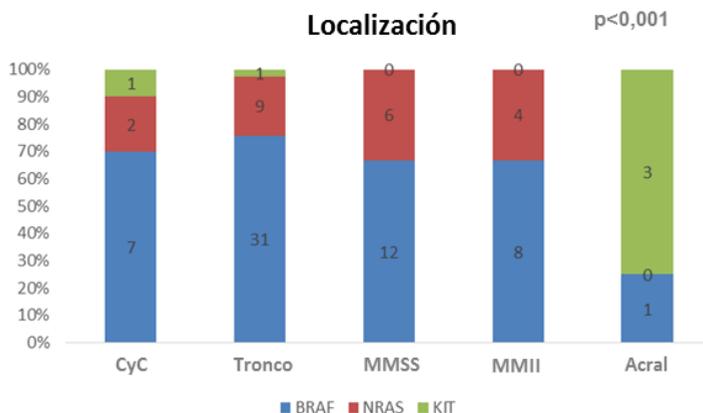


Figura 43: Mutaciones identificadas en los oncogenes *BRAF*, *NRAS* y *KIT* en nuestra serie de melanomas ($n=118$) en función de las diferentes localizaciones anatómicas.

Tabla 39: Asociación de las mutaciones con los parámetros clínico-patológicos en los melanomas primarios.

Gen	Estado mutacional		OR	95% IC	P-valor
	<i>Wt</i>	Mutado			
	N (%)	N (%)			
<i>KIT</i>	113 (95,8)	5 (4,2)			
Localización					
Cabeza y cuello	17 (34,4)	1 (5,6)			
Tronco	53 (98,1)	1 (1,9)			
MMSS	19 (100)	0	2,11	1,23-4,50	<0,001
MMII	18 (100)	0			
Acral	6 (66,7)	3 (33,3)			
Fotolocalización					
No expuesta	18 (85,7)	3 (14,3)			
Exposición intermitente	78 (98,7)	1 (1,3)	0,3	1,10-12,35	0,030
Exposición crónica	17 (94,4)	1 (5,6)			
Subtipo histológico					
LMM	10 (100)	0			
MES	77 (98,7)	1 (1,3)	4,75	1,66-13,62	<0,001
NM	20 (95,2)	1 (4,8)			
MLA	5 (62,5)	3 (37,5)			
Breslow					
≤1mm	56 (98,2)	1 (1,8)			
1-2mm	21 (100)	0			
2-4mm	22 (95,7)	1 (4,3)	2,67	1,07-6,64	0,025
>4mm	14 (82,4)	3 (17,6)			
Ulceración					
No	84 (98,8)	1 (1,2)	11,58	1,24-107,92	0,021
Sí	29 (87,9)	4 (12,1)			
<i>GRIN2A</i>	102 (86,4)	16 (13,6)			
Fotolocalización					
No expuesta	20 (95,2)	1 (4,8)			
Exposición intermitente	71 (89,9)	8 (10,1)	4,54	1,63-12,62	0,002
Exposición crónica	11 (61,1)	7 (38,9)			
Mitosis					
<1	53 (94,6)	3 (5,4)			
≥1	49 (79,0)	13 (21,0)	4,68	1,25-17,44	0,012
<i>PREX2</i>	101 (85,6)	17 (14,4)			
Ulceración					
No	78 (91,8)	7 (8,2)	4,84	1,65-14,15	0,004
Sí	23 (69,7)	10 (30,3)			
<i>RAC1</i>	109 (92,4)	9 (7,6)			
Fotolocalización					
No expuesta	21 (100)	0			
Exposición intermitente	75 (94,9)	5 (5,1)	5,1	1,41-18,45	0,013
Exposición crónica	14 (77,8)	4 (22,2)			
Tasa de crecimiento					
no-FGM	85 (95,5)	4 (4,5)	4,42	1,10-17,78	0,035
FGM	24 (86,2)	5 (13,8)			

Resultados

Tabla 39: Continuación

<i>NFI</i>	109 (92,4)	9 (7,6)			
Fotolocalización					
No expuesta	19 (90,5)	2 (9,5)			
Exposición intermitente	77 (97,5)	2 (2,5)	3,37	1,00-11,65	0,001
Exposición crónica	13 (71,2)	5 (27,8)			
Breslow					
≤1mm	55 (96,5)	2 (3,5)			
1-2mm	21 (100)	0	2,06	1,11-3,82	0,034
2-4mm	19 (82,6)	4 (17,4)			
>4mm	14 (82,4)	3 (17,6)			
Ulceración					
No	84 (98,8)	1 (1,2)	26,88	3,20-225,35	<0,001
Sí	25 (75,8)	8 (24,2)			
Tasa de crecimiento					
no-FGM	86 (96,6)	3 (3,4)	7,73	1,80-33,31	0,007
FGM	23 (79,3)	6 (20,7)			
<i>pTERT</i>	141 (70,1)	60 (29,9)			
Sexo					
Masculino	78 (76,5)	24 (23,5)	1,86	1,00-3,43	0,033
Femenino	63 (63,6)	36 (36,4)			
Localización					
Cabeza y cuello	16 (57,1)	12 (42,)			
Tronco	73 (81,1)	17 (18,9)			
MMSS	21 (58,3)	15 (41,7)	1,00	1,36-5,70	0,007
MMII	19 (57,6)	14 (42,4)			
Acral	12 (85,7)	2 (14,3)			
Subtipo histológico					
LMM	10 (66,7)	5 (33,3)			
MES	107 (73,3)	39 (26,7)	0,97	1,50-4,25	0,004
NM	10 (40,0)	15 (60,0)			
MLA	12 (92,3)	1 (7,7)			
Breslow					
≤1mm	97 (85,1)	17 (14,9)	2,09	1,54-2,82	<0,001
1-2mm	23 (54,8)	19 (45,2)			
2-4mm	12 (52,2)	11 (47,8)			
>4mm	9 (40,9)	13 (59,1)			
Ulceración					
No	120 (75)	40 (25)	2,86	1,40-5,80	0,003
Sí	21 (51,2)	20 (48,8)			
Mitosis					
<1	89 (84,0)	17 (16,0)	4,32	2,24-8,35	<0,001
≥1	52 (54,7)	43 (45,3)			
Regresión					
No	70 (64,2)	39 (35,8)	0,55	0,35-0,90	0,045
<50%	48 (72,7)	18 (27,3)			
>50%	23 (88,5)	3 (11,5)			
Tasa de crecimiento					
no-FGM	126 (75,9)	40 (24,1)	4,20	1,97-8,96	<0,001
FGM	15 (42,9)	20 (57,1)			
Estadio tumoral					
I-II	122 (73,1)	45 (26,9)	2,14	1,00-4,60	0,039
III-IV	19 (55,9)	15 (44,1)			
Recaída					
No	127 (73,0)	47 (27,0)	2,49	1,06-5,85	0,031
Sí	13 (52,0)	12 (48,0)			

LMM: Lentigo melanoma maligno; MES: Melanoma de extensión superficial; MN: Melanoma nodular; MLA: Melanoma lentiginoso acral; MMSS: Miembros superiores; MMII: Miembros inferiores; FGM: Melanoma de rápido crecimiento. pTERT: Promotor del gen *TERT*.

Las mutaciones en el gen *IDHI* no se asociaron de forma significativa a ninguna de las características clínico-patológicas estudiadas, si bien cabe destacar que los dos melanomas portadores de mutación se localizaban en áreas fotoexpuestas (sien y tórax), y presentaban características de mayor agresividad, como son mayor edad (>65 años), sexo masculino, índice de Breslow >2mm, presencia de ulceración, ≥ 1 mitosis/mm², y ausencia de regresión histológica. Asimismo, ambos melanomas con mutaciones en *IDHI* estaban dentro del grupo de los melanomas con recaída locorregional y/o a distancia. El análisis con el polimorfismo *rs11554137* no identificó asociación a ninguno de los parámetros clínico-patológicos estudiados.

Con respecto al promotor del gen *TERT*, en el análisis multivariante mantuvieron significación estadística el sexo [p= 0,002; OR=3,54 (1,58-7,96)], el subtipo histológico [p= 0,008; OR=0,35 (0,16-0,75)], el índice de Breslow [p= 0,003; OR=2,43 (1,34-4,42)], y las mitosis [p= 0,017; OR=2,81 (1,20-6,57)] (Figura 44).

Resultados

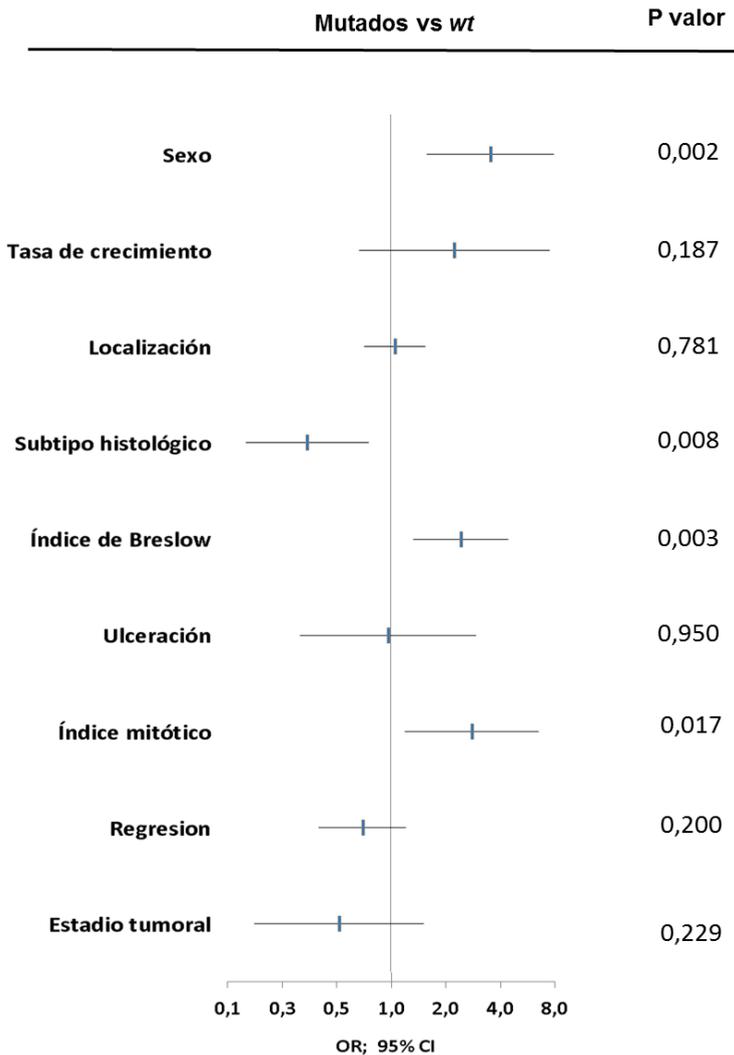


Figura 44: Representación del análisis multivariante de las mutaciones en el promotor del gen *TERT* mediante regresión logística. El sexo femenino ($p=0,002$), el subtipo histológico nodular ($p=0,008$), el elevado índice de Breslow ($p=0,003$) y la presencia de mitosis ($p=0,017$) se asociaron de forma independiente a las mutaciones en el promotor del gen *TERT*.

El análisis de forma aislada con el polimorfismo *rs2853669* del gen *TERT* no identificó asociación con ninguno de los parámetros clínico-patológicos estudiados. Sin embargo, estratificando los melanomas mutados en el gen *TERT* (n=36) en función de la presencia (n=11) /ausencia (n=25) del polimorfismo, se observó mayor porcentaje de melanomas con alto índice de Breslow, con presencia de mitosis y ulceración, y FGM, en el grupo de melanomas mutados que no eran portadores del polimorfismo comparado con los portadores del mismo (33,3% vs 16,7%, 79,2% vs 50%, 50% vs 25% y 41,7% vs 33,3%, respectivamente); sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significación estadística (p=0,501, p=0,081, p=0,141, y p=0,456, respectivamente). Adicionalmente, mediante la estratificación en base al polimorfismo, se demostró que la asociación de las mutaciones del gen *TERT* con el índice de Breslow, la presencia de mitosis y la ulceración se mantenía significativa al comparar los melanomas en ausencia del polimorfismo (n=78), y no se mantenía en los melanomas portadores del mismo (n=53) (Tabla 40).

Resultados

Tabla 40: Asociaciones de las mutaciones en el promotor del gen *TERT* tras la estratificación de los melanomas en función del polimorfismo rs2853669.

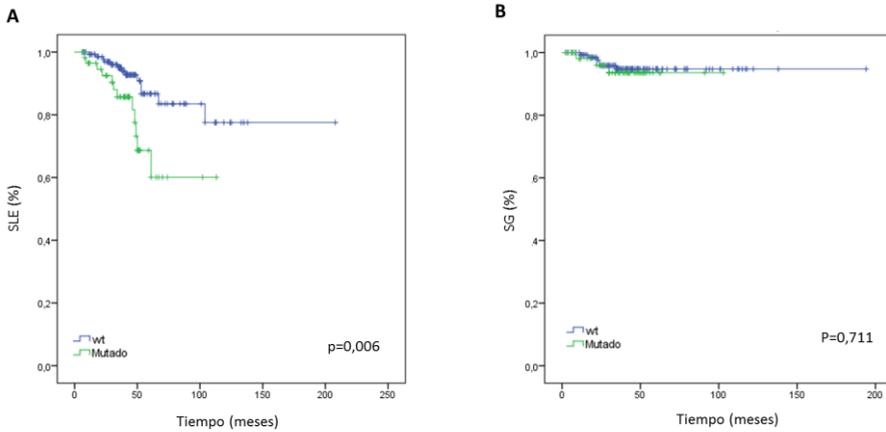
Polimorfismo rs2853669	Mutaciones promotor <i>TERT</i>		OR	95% IC	P-valor
	<i>Wt</i>	Mutado			
	N (%)	N (%)			
Ausencia de polimorfismo	53 (68)	25 (32)			
Breslow					
≤1mm	39 (86,7)	6 (13,3)			
1-2mm	7 (53,8)	6 (46,2)	2,46	1,50-4,03	<0,001
2-4mm	3 (27,3)	8 (72,7)			
>4mm	4 (44,4)	5 (55,6)			
Ulceración					
No	46 (78,0)	13 (22,0)	6,06	1,98-18,53	0,001
Sí	7 (36,8)	12 (63,2)			
Índice mitótico					
<1	31 (83,8)	6 (16,2)	4,46	1,53-12,98	0,004
≥1	22 (53,7)	19 (46,3)			
Presencia de polimorfismo	42 (79)	11 (21)			
Breslow					
≤1mm	30 (88,2)	4 (11,8)			
1-2mm	2 (50,0)	2 (50,0)	1,78	1,00-3,16	0,076
2-4mm	7 (77,8)	2 (22,2)			
>4mm	3 (50,0)	3 (50,0)			
Ulceración					
No	33 (80,5)	8 (19,5)	1,37	0,30-6,27	0,479
Sí	9 (75,0)	3 (25,0)			
Índice mitótico					
<1	29 (85,3)	5 (14,7)	2,67	0,69-10,38	0,136
≥1	13 (68,4)	6 (31,6)			

1.4. ASOCIACIÓN DE LAS MUTACIONES CON LA SUPERVIVENCIA

El único gen en el que se identificó asociación con la evolución clínica de los pacientes fue el gen *TERT*. El análisis de supervivencia mediante curvas Kaplan-Meier demostró que los melanomas portadores de mutaciones en el promotor del gen *TERT* presentaban una SLE significativamente menor que los melanomas no

portadores (Log-rank test; $p=0,006$) (Figura 45). No se identificó asociación significativa con la SG (Log-rank test; $p=0,711$).

Figura 45: Análisis univariante de SLE (A) y SG (B) mediante el método de Kaplan-Meier con las mutaciones en el promotor del gen *TERT*.



En el análisis de supervivencia con el polimorfismo *rs2853669* no se identificó asociación con la SLE ni la SG. Sin embargo, estratificando los melanomas en función de la presencia/ausencia del polimorfismo, se observó que la asociación significativa de las mutaciones del gen *TERT* con la SLE únicamente se mantenía en los melanomas mutados en ausencia del polimorfismo (Ausencia del polimorfismo: Log-rank test $p=0,043$; Presencia del polimorfismo: Log-rank test $p=0,166$) (Figura 46). En cuanto a la SG, ninguno de los dos grupos de melanomas mutados mostró una reducción significativa (Ausencia del polimorfismo: Log-rank test $p=0,921$; Presencia del polimorfismo: Log-rank test $p=0,336$).

Resultados

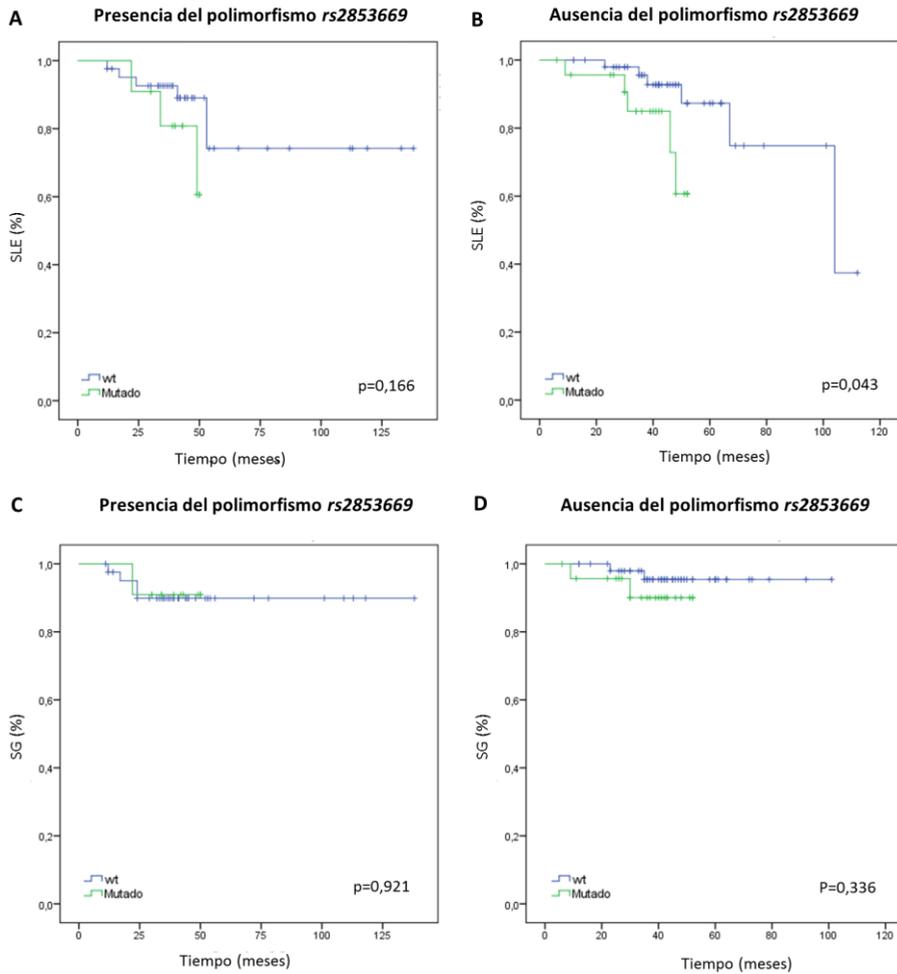


Figura 46: Análisis univariante de SLE (A y B) y SG (C y D) mediante el método de Kaplan-Meier con las mutaciones en el promotor del gen *TERT* estratificando los melanomas en función de la presencia o ausencia del polimorfismo *rs2853669*.

1.5. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS MELANOMAS PRIMARIOS ATENDIENDO A LOS CRITERIOS DE LA TCGA

Los melanomas primarios fueron clasificados acorde a la reciente clasificación genómica propuesta por el grupo de la TCGA (Akbari R *et al.*, 2015). El 94% (111/118) fueron correctamente clasificados en los cuatro subtipos propuestos (*BRAF*, *RAS*, *NF1*, triple-*wt*), mientras que en los siete restantes existieron mutaciones concurrentes en los genes *BRAF* y *NF1* (dos melanomas), *BRAF* y *NRAS* (tres melanomas), *KRAS* y *NF1* (dos melanomas) (Tabla 38; Figura 47A). Excluyendo los melanomas con mutaciones concurrentes, el 49% (54/111) se clasificaban en el subtipo *BRAF*, el 17% (19/111) en el subtipo *RAS*, 4% (5/111) en el subtipo *NF1*, y 30% (33/111) en el triple-*wt* (Figura 47B).

Con respecto a las características clínico-patológicas de los diferentes subtipos, se detectaron diferencias en la localización de los melanomas; así, los melanomas del subtipo triple-*wt* se localizaron con mayor frecuencia en áreas acrales comparados con los otros subtipos ($p=0,001$). Los melanomas del subtipo *NF1* se asociaron a mayor espesor tumoral ($p=0,031$), a la presencia de mitosis ($p=0,030$), y de ulceración ($p=0,017$). Además, el número medio de mutaciones por muestra resultó significativamente mayor en los melanomas del subtipo *NF1* ($p<0,001$). La frecuencia mutacional del promotor del gen *TERT* no difirió entre los distintos subtipos.

En el subtipo de melanomas triple-*wt* (33/111) identificamos mutaciones en otros genes entre los que destacaron el gen *GRIN2A*

Resultados

(9/33), *PREX2* (7/33), *ERBB4* (7/33), *MET* (5/33), *KIT* (4/33) y *PTEN* (4/33) (Figura 47D).

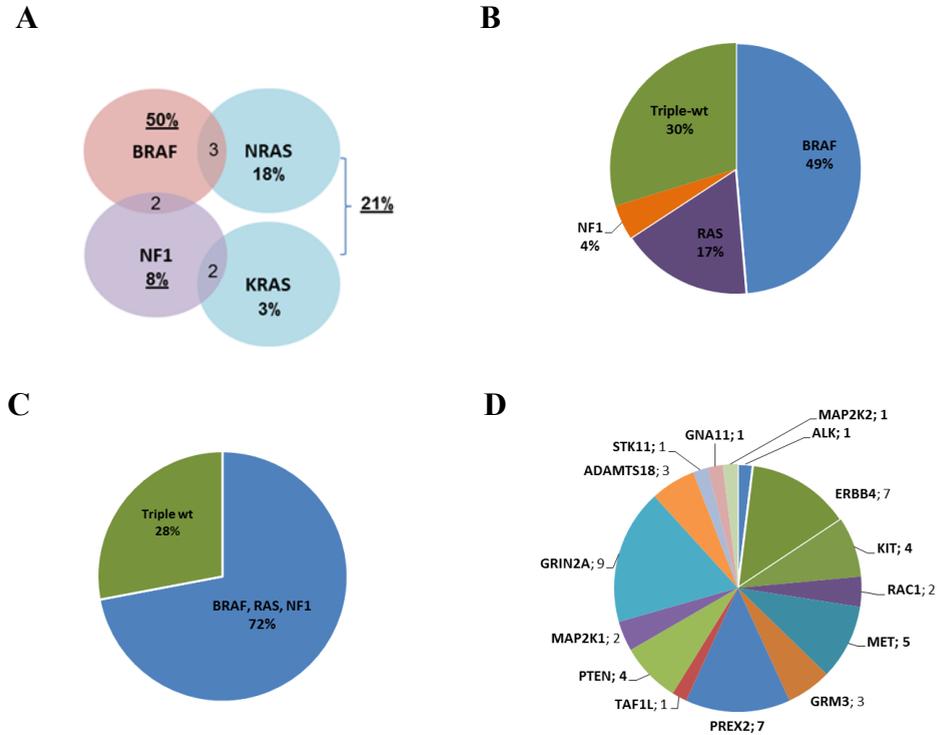


Figura 47: Clasificación molecular de los melanomas atendiendo a los criterios definidos por la TCGA. A: Mutaciones concurrentes entre los subtipos *BRAF*, *RAS* (genes *NRAS* y *KRAS*) y *NFI* (n=7). B: Clasificación molecular en los subtipos *BRAF*, *RAS*, *NFI* (excluyendo los melanomas con mutaciones concurrentes en dichos genes) y triple-*wt* (n=111). C: Clasificación molecular de melanomas considerando de forma global los subtipos *BRAF*, *RAS* y *NFI* (sin excluir los melanomas con mutaciones concurrentes) y el subtipo triple-*wt* (n=118). D: Mutaciones identificadas en otros genes en el subtipo triple-*wt* (n=33).

1.6. PREVALENCIA DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN MELANOMAS METASTÁSICOS

Se estudiaron un total de 12 melanomas metastásicos en los que previamente se había estudiado el tumor primario. De las metástasis estudiadas, seis fueron metástasis cutáneas, cinco fueron ganglionares y una fue pulmonar.

Con respecto a los genes *BRAF* y *NRAS*, en el 75% (9/12) de los melanomas primarios correspondientes se detectó mutación en el gen *BRAF* y el 25% (4/12) en el gen *NRAS*. Se identificó concordancia entre las mutaciones del tumor primario y metastásico en el 92% de los casos, con sólo un caso discordante en el que el tumor primario fue portador de doble mutación en el gen *BRAF* (p.Lys601Glu y p.Pro731Ser) y la metástasis cutánea presentó la mutación p.Gln61Arg en el gen *NRAS* (Tabla 41; caso 9). Dada la discordancia identificada se procedió a revisar la historia clínica. Se trataba de una paciente de 82 años con antecedentes personales de un melanoma nodular de alto riesgo (4,1mm de Breslow y ulcerado) localizado en antebrazo derecho, que un año más tarde desarrolló una lesión nodular en la pierna ipsilateral que fue diagnosticada de melanoma metastásico. Posteriormente desarrolló múltiples metástasis en tránsito alrededor de la cicatriz de la pierna, sin volver a presentar signos de recidiva tumoral en el antebrazo. Tres años más tarde desarrolló una metástasis ganglionar inguinal. La metástasis estudiada mediante NGS portadora de la mutación p.Gln61Arg correspondía a una de las metástasis en tránsito. Se procedió a estudiar la primera lesión desarrollada en la pierna por PCR en tiempo real y se detectó la misma mutación en el

Resultados

gen *NRAS* sin identificarse mutación concurrente en el gen *BRAF*. La metástasis ganglionar también fue estudiada por PCR en tiempo real obteniéndose los mismos hallazgos. Por tanto, se trataba de una paciente con antecedente de dos melanomas primarios, con concordancia en el perfil mutacional del melanoma primario de la pierna y las metástasis estudiadas. Teniendo en cuenta la revisión de este caso, finalmente identificamos una concordancia en todas las muestras estudiadas.

Tabla 41: Mutaciones identificadas en los genes *BRAF* y *NRAS* en las 12 muestras pareadas melanoma primario/metástasis de nuestra serie.

Caso	Primario			Metástasis		
	Gen	Mutación	FA (%)	Gen	Mutación	FA (%)
1	<i>BRAF</i>	Val600Glu	26,4	<i>BRAF</i>	Val600Glu	37,2
2	<i>BRAF</i>	Val600Glu	7,9	<i>BRAF</i>	Val600Glu	43,5
3	<i>NRAS</i>	Gln61Arg	6,8	<i>NRAS</i>	Gln61Arg	3,0
4	<i>NRAS</i>	Gln61Arg	7,4	<i>NRAS</i>	Gln61Arg	18,1
5	<i>NRAS</i>	Gln61Lys	32,9	<i>NRAS</i>	Gln61Lys	16,8
6	<i>BRAF</i>	Val600Glu	50,5	<i>BRAF</i>	Val600Glu	51,6
7	<i>BRAF</i>	Lys601Glu	17,0	<i>BRAF</i>	Lys601Glu	46,4
8	<i>BRAF</i>	Val600Glu	7,0	<i>BRAF</i>	Val600Glu	8,2
9	<i>BRAF</i>	Lys601Glu	15,0	<i>NRAS</i>	Gln61Arg	20,3
		Pro731Ser	18,3			
10	<i>BRAF</i>	Val600Glu	24,9	<i>BRAF</i>	Val600Glu	24,9
11	<i>BRAF</i>	Val600Glu	38,8	<i>BRAF</i>	Val600Glu	38,8
12	<i>BRAF</i>	Val600Glu	8,2	<i>BRAF</i>	Val600Glu	8,2

FA: Frecuencia alélica

De forma adicional, se compararon las variantes identificadas en el resto de genes incluidos en el panel. En el 75% (9/12) de las muestras metastásicas se detectaron las mismas variantes (benignas y patogénicas) que en el melanoma primario; mientras que en tres de las metástasis se detectaron mutaciones en el gen *PTEN* (p.Phe341fs, p.Arg47Lys y p.Tyr27Ter) que no estaban presentes en el primario, y en una muestra se detectó la mutación p.Arg183Gln en el gen *GNAQ*. (Tabla 42).

Tabla 42: Mutaciones adicionales identificadas en las metástasis.

Caso	Gen	Mutación	FA (%)
1		Ninguna	
2		Ninguna	
3		Ninguna	
4		Ninguna	
5	<i>GNAQ</i>	Arg183Gln	7,0
	<i>PTEN</i>	Phe341fs	21,7
6	<i>PTEN</i>	Arg47Lys	47,1
7		Ninguna	
8	<i>PTEN</i>	Tyr27Ter	3,0
9		Ninguna	
10		Ninguna	
11		Ninguna	
12		Ninguna	

Con respecto a las mutaciones en el promotor del gen *TERT*, se estudiaron 12 metástasis, de las cuales se disponía del estudio del tumor primario en 10 (los dos restantes fueron no valorables). Se identificó concordancia en el 90% (9/10) de las muestras, y 1 caso discordante, en el que sólo la metástasis era portadora de la mutación c.1-124/-125CC>TT. En ninguno de los melanomas primarios ni metastásicos se detectaron mutaciones en el gen *IDHI*.

2. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS

2.1. EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES

2.1.1. Estudio de sensibilidad analítica de los estudios de metilación mediante MLPA

El estudio de sensibilidad analítica de la tecnología MLPA para abordar el análisis de metilación de TSGs en el melanoma, fue realizado mediante diluciones seriadas de un estándar de ADN altamente metilado (*Universal Methylated Human DNA Standard*), demostrando un LoD de metilación del 2,5% (Tabla 43; Figura 48). Se detectó metilación con todas las sondas (26/26) estudiadas en las diluciones del estándar de ADN metilado al 50%, 20%, y 10%; sin embargo, en las diluciones del 5% y 2,5% se detectó metilación con el 80,77% (21/26) y 42,30% (11/26) de las sondas, respectivamente.

Dados los resultados del estudio de sensibilidad, y lo descrito previamente por otros autores (Henken *et al.*, 2007; Nygren *et al.*, 2005), se consideró que existía metilación cuando el cociente obtenido fue $\geq 10\%$. Porcentajes inferiores a este límite fueron considerados ruido de fondo.

Tabla 43: Ratios de metilación detectados con cada una de las sondas en las diluciones seriadas del estándar de ADN altamente metilado. Se muestran los resultados de metilación obtenidos por duplicado en cada dilución).

Sonda	Ratio de metilación											
	1 (100%)		0.5 (50%)		0.2 (20%)		0.1 (10%)		0.05 (5%)		0.025 (2.5%)	
	Dil 1.1	Dil 1.2	Dil 2.1	Dil 2.2	Dil 3.1	Dil 3.2	Dil 4.1	Dil 4.2	Dil 5.1	Dil 5.2	Dil 6.1	Dil 6.2
<i>TP73</i>	0,830	0,690	0,350	0,370	0,130	0,180	0,070	0,100	0,050	0,050	0,000	0,000
<i>CASP8</i>	0,940	0,870	0,490	0,520	0,200	0,230	0,130	0,130	0,070	0,070	0,050	0,050
<i>VHL</i>	0,890	0,790	0,360	0,400	0,140	0,170	0,090	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>RARB</i>	1,000	0,850	0,470	0,480	0,210	0,210	0,130	0,130	0,070	0,080	0,050	0,000
<i>MLHI</i>	0,850	0,780	0,400	0,420	0,160	0,220	0,090	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>MLHI</i>	0,890	0,820	0,440	0,490	0,190	0,190	0,110	0,090	0,060	0,050	0,000	0,000
<i>RASSF1</i>	0,970	0,780	0,400	0,450	0,170	0,200	0,080	0,090	0,050	0,000	0,000	0,000
<i>RASSF1</i>	0,790	0,550	0,250	0,330	0,110	0,150	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>FHIT</i>	0,990	0,700	0,380	0,410	0,180	0,200	0,100	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>APC</i>	1,080	1,040	0,600	0,590	0,270	0,250	0,160	0,140	0,100	0,080	0,060	0,070
<i>ESR1</i>	1,080	1,040	0,570	0,540	0,280	0,260	0,120	0,140	0,090	0,080	0,050	0,000
<i>CDKN2A</i>	0,990	0,960	0,520	0,520	0,260	0,250	0,150	0,140	0,100	0,080	0,000	0,000
<i>CDKN2B</i>	1,100	1,060	0,570	0,600	0,280	0,240	0,140	0,140	0,080	0,080	0,040	0,040
<i>DAPK1</i>	1,101	0,880	0,540	0,530	0,210	0,220	0,120	0,110	0,070	0,060	0,000	0,000
<i>KLN</i>	1,160	0,980	0,590	0,610	0,300	0,260	0,150	0,140	0,090	0,090	0,060	0,060
<i>CD44</i>	0,970	0,940	0,480	0,490	0,230	0,250	0,120	0,110	0,070	0,070	0,000	0,000
<i>GSTP1</i>	1,000	0,990	0,510	0,500	0,250	0,240	0,110	0,140	0,070	0,070	0,000	0,000
<i>ATM</i>	1,090	0,920	0,510	0,530	0,220	0,230	0,150	0,130	0,080	0,090	0,000	0,000
<i>CADM1</i>	1,020	1,020	0,510	0,540	0,250	0,280	0,130	0,130	0,070	0,060	0,000	0,000
<i>CDKN1B</i>	0,880	0,800	0,370	0,390	0,160	0,190	0,090	0,090	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>CHFR</i>	0,910	0,780	0,420	0,460	0,160	0,180	0,100	0,100	0,060	0,060	0,030	0,000
<i>BRC42</i>	1,060	0,980	0,580	0,610	0,300	0,250	0,150	0,130	0,080	0,070	0,000	0,000
<i>CDH13</i>	0,850	0,850	0,420	0,450	0,190	0,240	0,100	0,120	0,060	0,070	0,050	0,060
<i>HIC1</i>	1,020	0,890	0,490	0,550	0,230	0,210	0,120	0,110	0,060	0,070	0,040	0,000
<i>BRCA1</i>	0,910	0,850	0,420	0,440	0,170	0,210	0,110	0,100	0,050	0,050	0,040	0,030
<i>TIMP3</i>	1,060	0,890	0,470	0,510	0,220	0,240	0,120	0,130	0,070	0,070	0,040	0,030
Media de metilación	0,975	0,873	0,466	0,490	0,210	0,221	0,115	0,112	0,058	0,054	0,020	0,013
N° sondas detectadas (%)	26 (100)	26 (100)	26 (100)	26 (100)	26 (100)	26 (100)	26 (100)	25 (96,15)	21 (80,77)	21 (80,77)	11 (42,30)	7 (26,92)
Desviación estándar	0,078	0,095	0,070	0,060	0,043	0,027	0,021	0,022	0,024	0,026	0,023	0,019

Dil: Dilución

Resultados

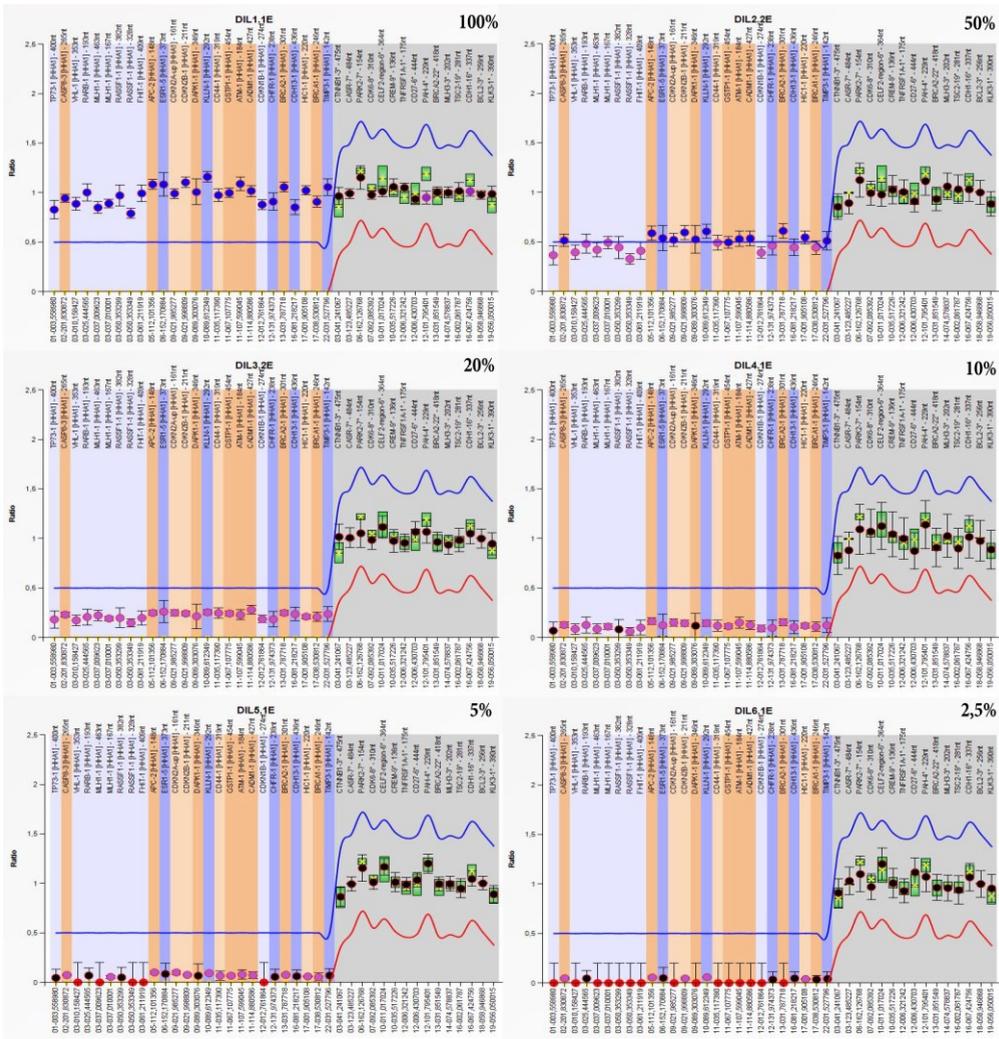


Figura 48: Análisis comparativo que muestra los porcentajes de metilación obtenido mediante el *software Cofallyser* en las diluciones seriadas del estándar de ADN metilado. En el eje horizontal se representa cada sonda y en el eje vertical el ratio de metilación. Las sondas de la parte izquierda (color gris) corresponden a las sondas de referencia.

2.1.2. Prevalencia de metilación de genes supresores tumorales en el melanoma

Se procesaron un total de 193 melanomas primarios. En el 59% (114/193) de las muestras se identificó metilación en alguno de los TSGs, y en el 25% (48/193) existió metilación en tres o más genes. Se detectó metilación en el 92% (22/24) de los TSGs estudiados (Figura 49).

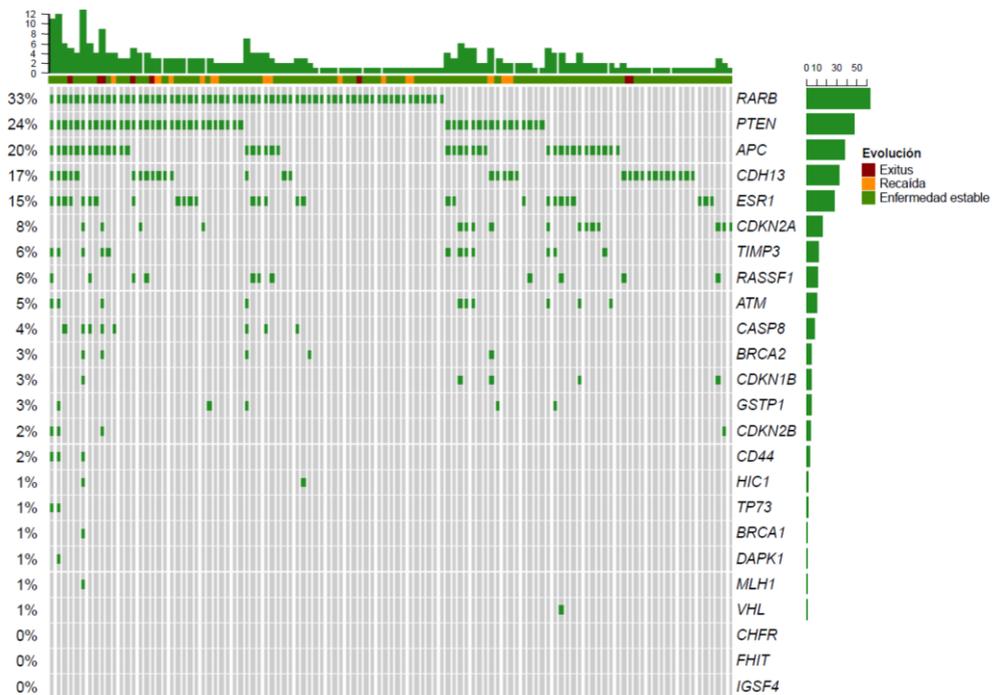


Figura 49: Frecuencia de metilación en los 24 TSGs. Cada columna representa una muestra con metilación (n=114) y cada fila un gen (n=24). En la barra superior están representados el nº total de genes metilados por muestra y la evolución de los pacientes (enfermedad estable, recaída y exitus).

Resultados

Los genes más frecuentemente metilados fueron *RARB* (33%; 63/170), *PTEN*, (24%; 47/193), *APC* (20%; 38/193), *CDHI3* (17%; 32/193), *ESR1* (15%; 28/193), *CDKN2A* (6%; 16/193), *TIMP3* (6%; 12/193) y *RASSF1* (6%; 11/193). Adicionalmente, se detectó metilación concurrente en los genes *RARB* y *PTEN* en el 15% de las muestras (28/193).

2.1.3. Asociación de la metilación con los parámetros clínico-patológicos

La prevalencia de metilación varió de forma significativa en función de la edad de los pacientes, con mayores tasas de metilación en pacientes de más de 65 años en los genes *RARB* ($p < 0.001$), *PTEN* ($p = 0,008$), *APC* ($p = 0,006$), *CDHI3* ($p = 0,039$), y *ESR1* ($p = 0,015$). Adicionalmente, la prevalencia de metilación varió en función de la localización anatómica del tumor primario, con tasas más elevadas de metilación en los genes *PTEN* ($p = 0,003$) y *CDHI3* ($p = 0,001$) en los melanomas de localización acral.

Se identificó asociación entre los melanomas con mayor índice de Breslow y la metilación en los genes *RARB* ($p < 0,001$), *PTEN* ($p < 0,001$), *CDHI3* ($p = 0,001$), y *RASSF1* ($p = 0,003$). Asimismo, la metilación en los genes *RARB*, *PTEN*, *APC* y *CDHI3* se asoció a la presencia de mitosis ($p < 0,001$; $p = 0,004$; $p = 0,006$; y $p = 0,013$, respectivamente), y ulceración ($p = 0,019$; $p < 0,001$, $p = 0,001$, y $p = 0,006$, respectivamente). Con respecto a la tasa de crecimiento, la metilación en *RARB*, *PTEN*, *APC* y *RASSF1* se asoció significativamente con FGM ($p = 0,002$, $p = 0,004$, $p = 0,001$, y $p = 0,027$,

respectivamente). Los melanomas con estadios más avanzados presentaron con frecuencia metilación en los genes *RARB* ($p < 0,001$), *PTEN* ($p < 0,001$), y *CDH13* ($p < 0,001$).

Las asociaciones de los parámetros clínico-patológicos con la metilación de TSGs que resultaron estadísticamente significativas se detallan en la tabla 44.

2.1.4. Asociación de la metilación con otros parámetros moleculares

Las mutaciones en el promotor del gen *TERT* se asociaron con la metilación en los genes *RARB* ($p = 0,007$), y *RASSF1* ($p = 0,038$). Por el contrario, no se identificó asociación entre la metilación y las mutaciones en el resto de los genes estudiados mediante NGS, PCR en tiempo real o Sanger; si bien cabe destacar que en las dos únicas muestras con mutación en el gen *IDH1* se identificó metilación en un total de tres genes, siendo en ambas muestras uno de ellos el gen *RARB*.

Resultados

Tabla 44: Asociación de la metilación en los genes *RARB*, *PTEN*, *APC*, *CDH13*, *ESR1* y *RASSF1* con las características clínico-patológicas y moleculares.

Gen	Metilación		OR	95% IC	P-valor
	M	NM			
	N (%)	N (%)			
<i>RARB</i>					
Edad					
<40	2 (10,5)	17 (89,5)	3,2	1,8-5,6	<0,001
40-65	20 (22,0)	71 (78,0)			
>65	41 (49,4)	42 (50,6)			
Breslow					
≤1mm	22 (19,6)	90 (80,4)	1,9	1,4-2,6	<0,001
1-2mm	15 (38,5)	24 (61,5)			
2-4mm	15 (75,0)	5 (25,0)			
>4mm	11 (50,0)	11 (50,0)			
Ulceración					
No	45 (28,8)	111 (71,2)	2,3	1,1-4,8	0,019
Sí	18 (48,6)	19 (51,4)			
Índice mitótico					
<1	20 (19,2)	84 (80,8)	3,9	2,0-7,4	<0,001
≥1	43 (48,3)	46 (51,7)			
Tasa de crecimiento					
Non-FGM	44 (27,7)	115 (72,3)	3,3	1,5-7,0	0,002
FGM	19 (55,9)	15 (44,1)			
Estadio tumoral					
I-II	43 (26,5)	119 (73,5)	5	2,2-11,3	<0,001
III-IV	20 (64,5)	11 (35,5)			
Recaída					
I-II	46 (27,4)	122 (72,6)	5,3	2,1-13,3	<0,001
III-IV	16 (66,7)	8 (33,3)			
Exitus					
I-II	56 (30,4)	128 (69,6)	6,8	1,3-35,0	0,015
III-IV	6 (75,0)	2 (25,0)			
Mutaciones en el gen <i>TERT</i>					
Wt	34 (25,6)	99 (74,4)	2,4	1,2-4,6	0,007
Mutado	25 (45,5)	30 (54,5)			
<i>PTEN</i>					
Sexo					
Varón	32 (32,0)	68 (68,0)	0,4	0,2-0,8	0,001
Mujer	15 (16,1)	78 (83,9)			
Edad					
<40	1 (5,3)	18 (94,7)	3	1,6-5,7	0,008
40-65	15 (16,5)	76 (83,5)			
>65	31 (37,3)	52 (62,7)			
Localización anatómica					
Cabeza y cuello	8 (27,6)	21 (72,4)	1,4	1,0-1,8	0,003
Tronco	16 (18,4)	71 (81,6)			
MMSS	7 (20,0)	28 (80,0)			
MMII	7 (24,1)	22 (75,9)			
Acral	9 (69,2)	4 (30,8)			
Subtipo histológico					
LMM	5 (33,3)	10 (66,7)	1,6	1,0-2,4	0,001
MES	28 (19,7)	114 (80,3)			
MN	5 (22,7)	17 (77,3)			
MLA	9 (75,0)	3 (25,0)			
Otros	0 (0)	2 (100,0)			

Tabla 44: Continuación

Breslow						
≤1mm	14 (12,5)	98 (87,5)				
1-2mm	12 (30,8)	27 (69,2)				
2-4mm	12 (60,0)	8 (40,0)	1,9	1,4-2,6	0,001	
>4mm	9 (40,9)	13 (59,1)				
Ulceración						
Yes	27 (17,3)	129 (82,7)				
No	20 (54,1)	17 (45,9)	5,6	2,6-12,1	<0,001	
Índice mitótico						
<1	17 (16,3)	87 (83,7)				
≥1	30 (33,7)	59 (66,3)	2,6	1,3-5,1	0,004	
Regresión						
No	34 (33,3)	68 (66,7)				
<50%	9 (13,8)	56 (86,2)	0,5	0,3-0,8	0,009	
>50%	4 (15,4)	22 (84,6)				
Tasa de crecimiento						
SGM	32 (20,1)	127 (79,9)				
FGM	15 (44,5)	19 (55,9)	3,1	1,4-6,8	0,004	
Estadio tumoral						
I-II	31 (19,1)	131 (80,9)				
III-IV	16 (51,6)	15 (48,4)	4,5	2,0-10,0	<0,001	
Recaída						
I-II	33 (19,6)	135 (80,4)				
III-IV	13 (54,2)	11 (45,8)	4,8	1,9-11,7	0,001	
Exitus						
I-II	41 (22,3)	143 (77,7)				
III-IV	5 (62,5)	3 (37,5)	5,8	1,3-25,3	0,02	
APC						
Edad						
<40	0 (0)	19 (100,0)				
40-65	14 (15,4)	77 (84,6)	2,8	1,4-5,4	0,006	
>65	24 (28,9)	59 (71,1)				
Localización anatómica						
Cabeza y cuello	14 (48,3)	15 (51,7)				
Tronco	12 (13,8)	75 (86,2)				
MMSS	4 (11,4)	31 (88,6)	0,7	0,5-1,0	0,001	
MMII	6 (20,7)	23 (79,3)				
Acral	2 (15,4)	11 (84,6)				
Ulceración						
Yes	23 (14,7)	133 (85,3)				
No	15 (40,5)	22 (59,5)	3,9	1,8-8,7	0,001	
Índice mitótico						
<1	13 (12,5)	91 (87,5)				
≥1	25 (28,1)	64 (71,9)	2,7	1,3-5,7	0,006	
Tasa de crecimiento						
SGM	24 (15,1)	135 (84,9)				
FGM	14 (41,2)	20 (58,8)	3,9	1,7-8,8	0,001	
CDH13						
Edad						
<40	0 (0)	19 (100)				
40-65	13 (14,3)	78 (85,7)	2,3	1,2-4,6	0,039	
>65	19 (22,9)	64 (77,1)				
Localización anatómica						
Cabeza y cuello	0 (0)	29 (100)				
Tronco	13 (14,9)	74 (85,1)				
MMSS	6 (17,1)	29 (82,9)	1,8	1,3-2,6	0,001	
MMII	6 (20,7)	23 (79,3)				
Acral	7 (53,8)	6 (46,2)				

Resultados

Tabla 44: Continuación

Fotolocalización						
No expuesta	7 (25,9)	20 (74,1)				
Exposición intermitente	25 (18,1)	113 (81,9)	0,4	0,2-0,8	0,023	
Exposición crónica	0 (0)	28 (100)				
Subtipo histológico						
LMM	0 (0)	15 (100)				
MES	20 (14,1)	122 (85,9)				
MN	4 (18,2)	18 (81,8)	2,5	1,5-4,1	0,001	
MLA	7 (58,3)	5 (41,7)				
Otros	1 (50)	1 (50,0)				
Breslow						
≤1mm	11 (9,8)	101				
1-2mm	7 (17,9)	32				
2-4mm	9 (45,0)	11	1,6	1,2-2,3	0,001	
>4mm	5 (22,7)	17				
Ulceración						
No	20 (12,8)	136 (87,2)				
Sí	12 (32,4)	25 (67,6)	3,3	1,4-7,5	0,006	
Índice mitótico						
<1	11 (10,6)	93 (89,4)				
≥1	21 (23,6)	68 (76,4)	2,6	1,2-5,7	0,013	
Estadio tumoral						
I-II	18 (11,1)	144 (88,9)				
III-IV	14 (45,2)	17 (54,8)	6,6	2,8-15,5	<0,001	
Recaída						
I-II	23 (13,7)	145 (86,3)				
III-IV	9 (37,5)	15 (62,5)	3,8	1,5-9,6	0,007	
Exitus						
I-II	28 (15,2)	156 (84,8)				
III-IV	4 (50,0)	4 (50,0)	5,6	1,3-23,6	0,028	
ESR1						
Edad						
<40	1 (5,3)	18 (94,7)				
40-65	8 (8,8)	83 (91,2)	2,7	1,3-5,8	0,015	
>65	19 (22,9)	64 (77,1)				
RASSF1						
Breslow						
≤1mm	3 (2,7)	109 (97,3)				
1-2mm	2 (5,1)	37 (94,9)				
2-4mm	1 (5,0)	19 (95,0)	2,1	1,3-3,6	0,003	
>4mm	5 (22,7)	17 (77,3)				
Tasa de crecimiento						
No-FGM	6 (3,8)	153 (96,2)				
FGM	5 (14,7)	29 (85,3)	4,4	1,2-15,3	0,027	
Mutaciones en el gen TERT						
Wt	4 (3,0)	129 (97,0)				
Mutado	6 (10,9)	49 (89,1)	3,9	1,1-14,6	0,038	

M: Metilado; NM: No metilado; LMM: Lentigo melanoma maligno; MES: Melanoma de extensión superficial; MN: Melanoma nodular; MLA: Melanoma lentiginoso acral; MMSS: Miembros superiores; MMII: Miembros inferiores; FGM: Melanoma de rápido crecimiento.

2.1.5. Asociación de la metilación de TSGs con la supervivencia de pacientes con melanoma

Los análisis de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier mostraron que los pacientes con tres o más genes hipermetilados presentaban menor SLE (Log-rank test; $p=0.050$) y menor SG (Log-rank test; $p=0.049$). Los pacientes con hipermetilación en *RARB*, *PTEN* y *CDH13* presentaban menor SLE ($p<0.001$, $p=0,003$, y $p=0,019$, respectivamente) (Figura 50).

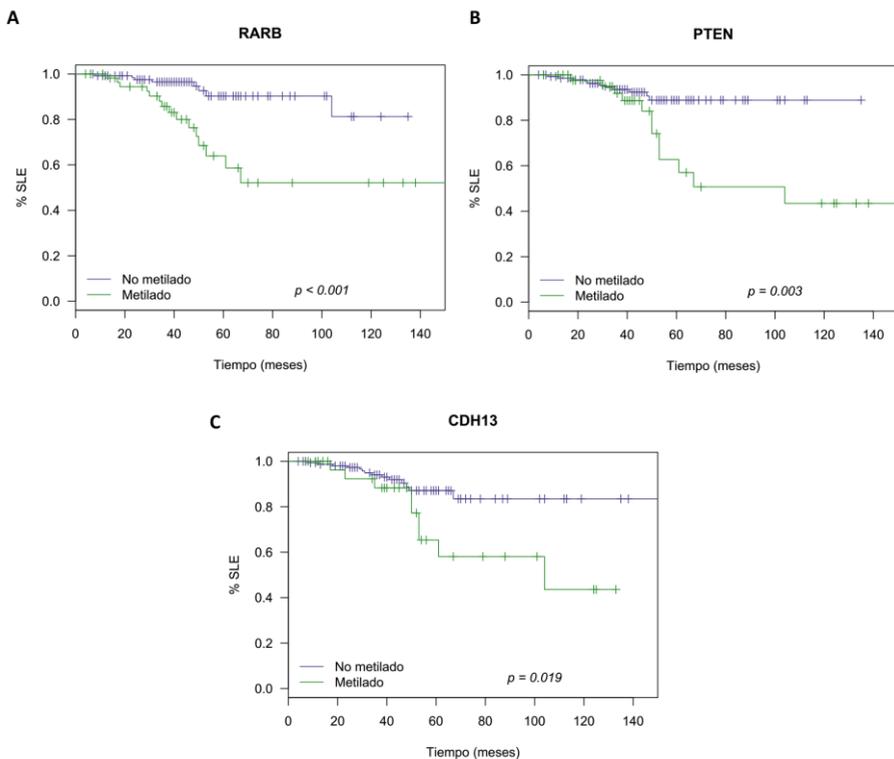


Figura 50: Análisis univariante de SLE mediante el método de Kaplan-Meier con los genes *RARB* (A), *PTEN* (B) y *CDH13* (C). Las gráficas representan una menor SLE en pacientes con metilación en estos genes.

Resultados

Asimismo, el análisis mostró que la metilación aberrante de los genes *RARB*, *PTEN*, y *CDH13* se correlacionaba con menor SG ($p=0.016$, $p=0.044$, y $p=0.003$, respectivamente) (Figura 51).

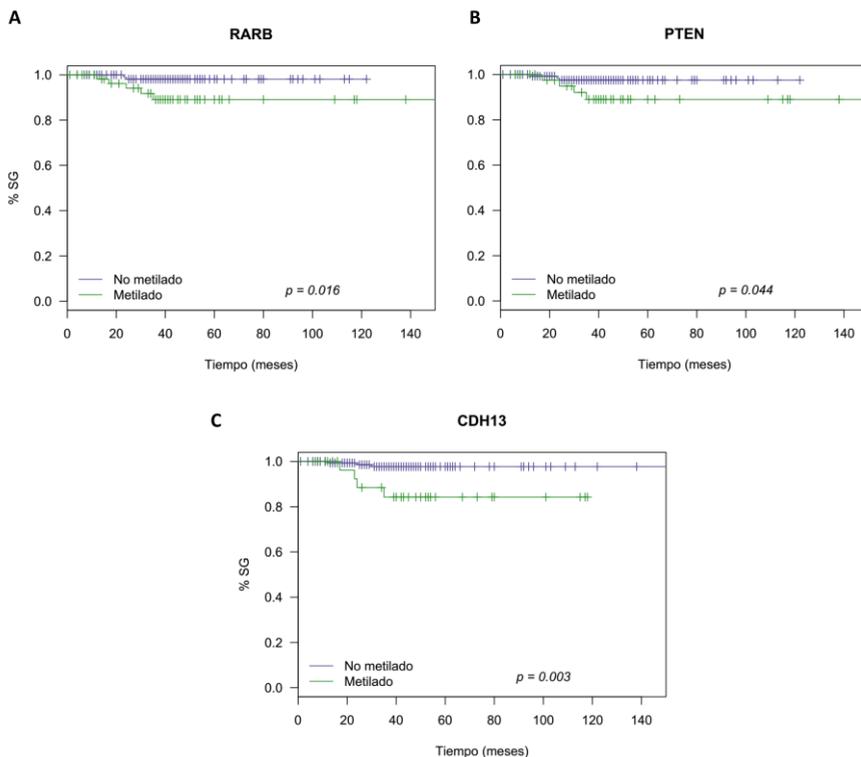


Figura 51: Análisis univariante de SG mediante el método de Kaplan-Meier con los genes *RARB* (A), *PTEN* (B) y *CDH13* (C). Las gráficas representan una menor SG en pacientes con metilación en estos genes.

El análisis multivariante mediante regresión de Cox demostró que las variables asociadas de forma independiente a una menor SLE y SG eran el índice de Breslow ($p<0,001$ y $p=0,003$), la ulceración ($p=0.048$ y $p=0,008$, respectivamente) y la metilación en el gen *RARB* ($p<0,001$ y $p=0,043$, respectivamente) (Figura 52).

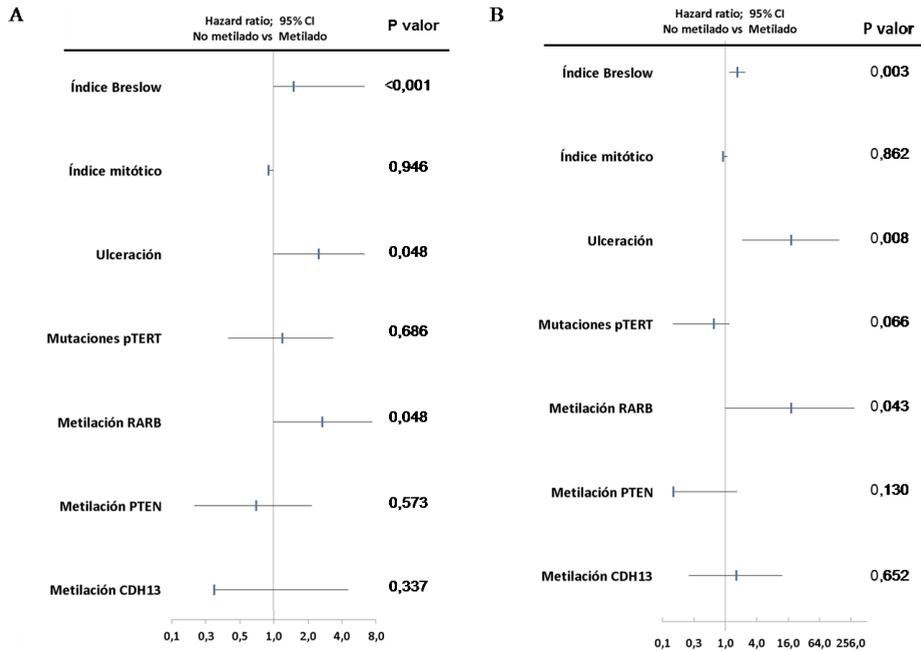


Figura 52: Representación del análisis multivariante de SLE (A) y SG (B) mediante regresión de Cox incluyendo la metilación en los genes *RARB*, *PTEN* y *CDH13* junto con las principales variables con valor pronóstico en el melanoma (*El índice de Breslow y las mitosis se han incluido como variables continuas). Hazard ratios superiores a 1 indican mayor probabilidad de recaída (SLE) y de exitus (SG).

Resultados

2.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE microRNAS EN EL MELANOMA

2.2.1. Análisis de los perfiles de expresión de microRNAs mediante arrays

El estudio de los perfiles de expresión de miRNAs se realizó empleando los *arrays GeneChip miRNA 4.0* (Affimetrix). Se procesaron un total de 22 muestras, divididas en dos grupos de estudio según sus características clínico-patológicas y moleculares: índice de Breslow ($7 \leq 1\text{mm}$ y $15 > 1\text{mm}$); presencia de ulceración (9 ulcerados y 13 no ulcerados); IM (8 < 1 mitosis y 14 ≥ 1 mitosis); presencia de regresión histológica (10 con regresión y 12 sin regresión); estado mutacional del promotor del gen *TERT* (11 melanomas mutados y 11 wt); tasa de crecimiento (11 FGM y 11 no-FGM).

Se realizó el análisis con el software *Partek Genomics Suite* para cada una de las variables de estudio. Se identificaron 101 miRNAs diferencialmente expresados [($p < 0,01$; *Fold change* (FC):5, and *False Discovery Rate correction* (FDR)] en base al índice de Breslow, 79 ($p < 0,01$, FC4) en base a la ulceración, 78 ($p < 0,01$; FC 5) en base al índice mitótico, 76 ($p < 0,01$, FC: 4, FDR) en base a la presencia de regresión, 117 ($p < 0,01$ FC: 2) en base a la tasa de crecimiento, y 97 ($p < 0,02$; FC:2, y FDR) en base a al estado mutacional del gen *TERT*. Los análisis de *cluster* jerárquico (ACJ) y de componentes principales (ACP) están representados en las figuras 53-58.

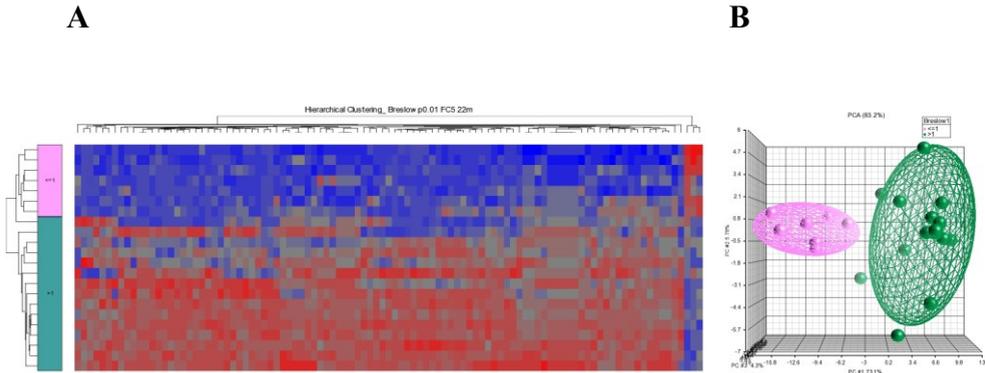


Figura 53: Resultados del perfil de expresión de 101 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del índice de Breslow. A: Análisis *Cluster* Jerárquico (ACJ) de los niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados ($p < 0,01$; FC 5; and FDR). B: Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra la separación de las muestras incluidas en el estudio en dos grupos en base a los miRNAs diferencialmente expresados.

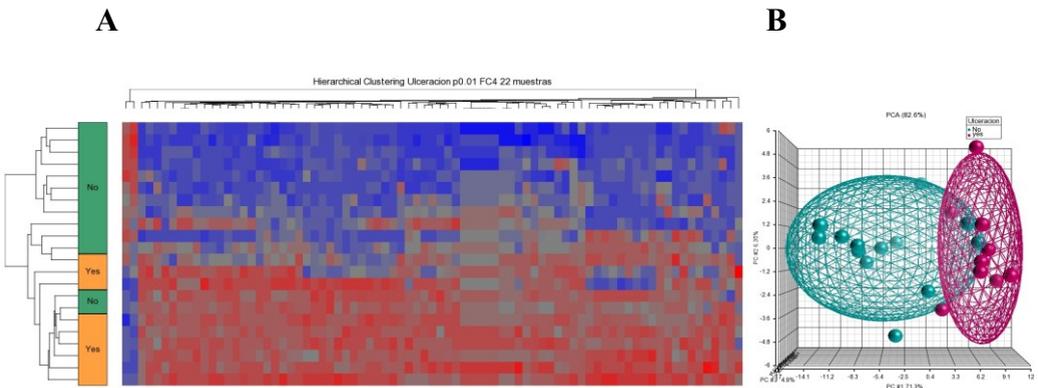
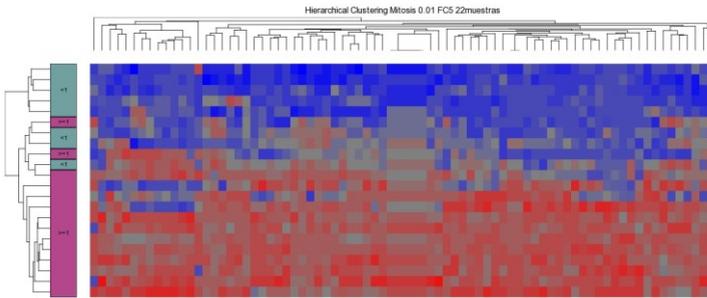


Figura 54: Resultados del perfil de expresión de 79 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del índice de la ulceración. A: Análisis *Cluster* Jerárquico (ACJ) de los niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados ($p < 0,01$, FC4). B: Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra la separación de las muestras incluidas en el estudio en dos grupos en base a los miRNAs diferencialmente expresados.

Resultados

A



B

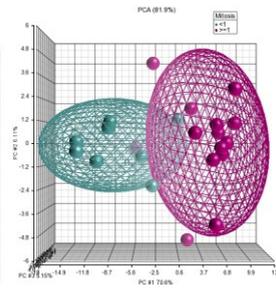
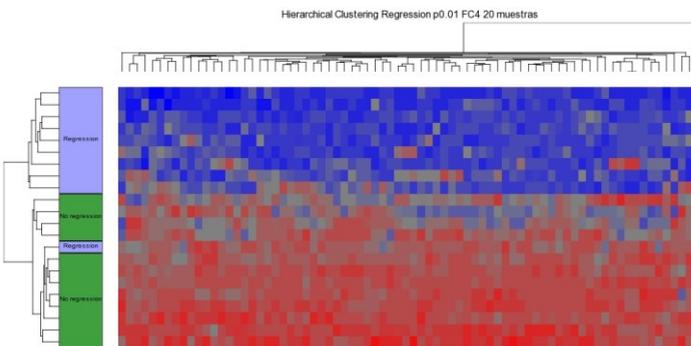


Figura 55: Resultados del perfil de expresión de 78 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del índice de las mitosis. A: Análisis Cluster Jerárquico (ACJ) de los niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados ($p < 0,01$, FC 5). B: Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra la separación de las muestras incluidas en el estudio en dos grupos en base a los miRNAs diferencialmente expresados.

A



B

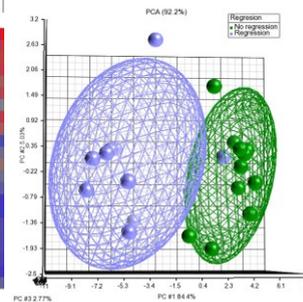


Figura 56: Resultados del perfil de expresión de 76 miRNAs en 22 melanomas primarios en función de la regresión. A: Análisis Cluster Jerárquico (ACJ) de los niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados ($p < 0,01$, FC 4, FDR). B: Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra la separación de las muestras incluidas en el estudio en dos grupos en base a los miRNAs diferencialmente expresados.

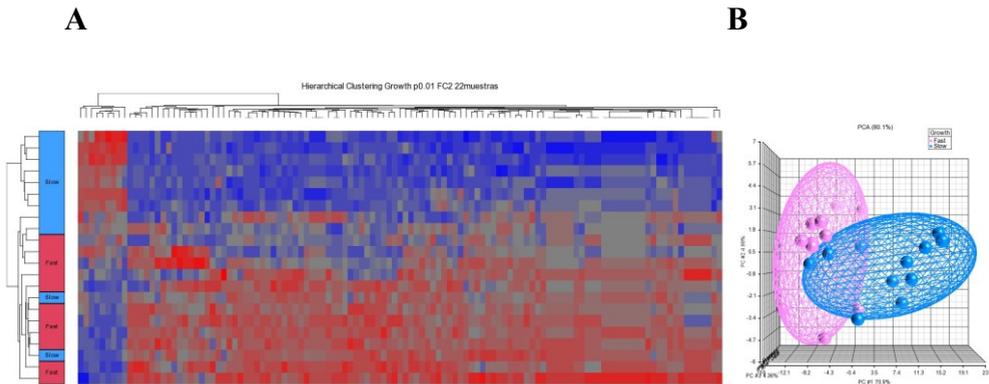


Figura 57: Resultados del perfil de expresión de 117 miRNAs en 22 melanomas primarios en función de la tasa de crecimiento. A: Análisis *Cluster* Jerárquico (ACJ) de los niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados ($p < 0,01$ FC: 2). B: Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra la separación de las muestras incluidas en el estudio en dos grupos en base a los miRNAs diferencialmente expresados.

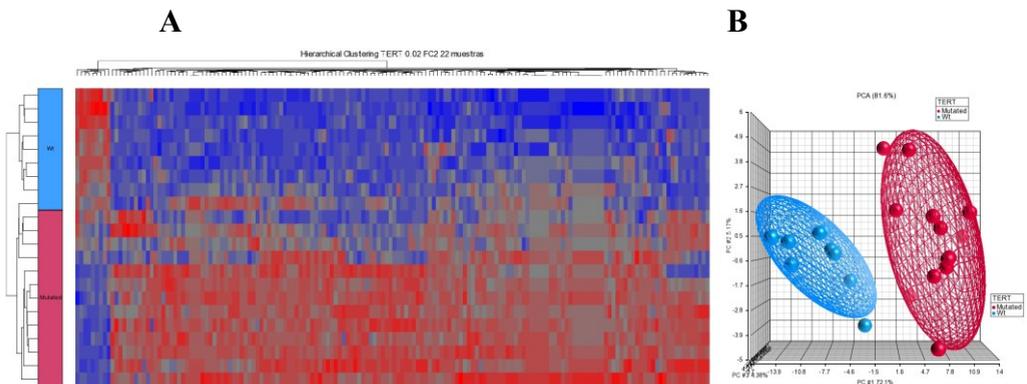


Figura 58. Resultados del perfil de expresión de 97 miRNAs en 22 melanomas primarios en función del estado mutacional del gen *TERT*. A: Análisis *Cluster* Jerárquico (ACJ) de los niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados ($p < 0,02$; FC 2, FDR). B: Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra la separación de las muestras incluidas en el estudio en dos grupos en base a los miRNAs diferencialmente expresados.

Resultados

2.2.2. Selección de una firma de microRNAs con valor pronóstico en melanoma y su validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

En base a la significación estadística y FC obtenidos mediante el análisis con el programa *Partek Genomics Suite*, se seleccionaron inicialmente ocho microRNAs (miR-138-5p, miR -34a-5p, miR-130b-3p, miR-500a-5p, miR-339-5p, miR-885-3p, miR-30b-5p, miR-197-3p) con expresión diferencial entre los grupos de estudio. Se utilizó como criterio de selección aquellos miRNAs diferencialmente expresados atendiendo a dos o más de las variables clínico-patológicas con valor pronóstico (Tabla 45). Asimismo, en base a los resultados de los *arrays* se seleccionó el SNORD U95 como miRNA control al no identificar diferencias significativas en su expresión en las diferentes muestras estudiadas.

Tabla 45: Selección de miRNAs diferencialmente expresados comunes entre las distintas variables de estudio.

Variable	<i>TERT</i>	T. crecimiento	Breslow	Ulceración	I. mitótico	Regresión
Nivel significación/FC	p<0,05/FC2 □	p<0,01/FC2	p<0,05/FC2	p<0,05/FC2	p<0,05/FC2	p<0,05/FC2
MicroRNAs diferencialmente expresados	miR-30b-5p	miR-339-5p	miR-30b-5p	miR-339-5p	miR-30b-5p	miR-885-3p
	miR-339-5p	miR 197-3p	miR-339-5p	miR-500 a-5p	miR-339-5p	
	miR-500 a-5p	miR-30b-5p	miR-500a-5p	miR-138-5p	miR-34a-5p	
	miR-130b-3p		miR-130b-3p		miR-138-5p	
	miR-138-5p		miR-138-5p		miR-500a-5p	
	miR 197-3p		miR-34a-5p			
			miR-885-3p			

El estudio de expresión de los ocho microRNAs mediante la tecnología de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), en las 22 muestras de melanoma previamente utilizadas en el *array*, permitió subseleccionar cuatro de ellos (miR-138-5p, miR-34a-5p, miR-130b-

3p, miR-30b-5p) al mantener la significación estadística para las mismas variables clínico-patológicas aplicando el test ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

2.2.3. Validación de los microRNAs más relevantes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Se estudiaron los cuatro miRNAs seleccionados en un total de 179 melanomas primarios, y se analizó la asociación entre la expresión de los miRNAs y las características clínico-patológicas utilizando ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

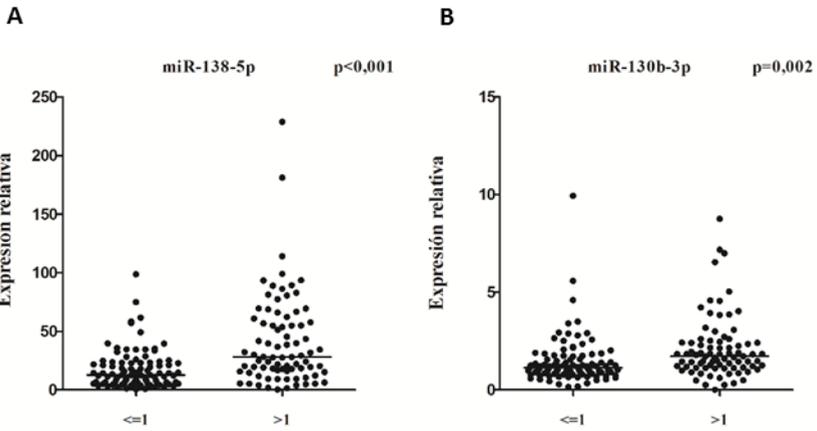
Se detectó sobreexpresión de miR-138-5p y miR-130b-3p en melanomas con mayor índice de Breslow (atendiendo a la subdivisión del Breslow en dos categorías: $p < 0,001$ y $p = 0,002$, respectivamente; y en cuatro categorías: $p < 0,001$ y $p = 0,001$, respectivamente), con presencia de mitosis ($p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente), y ulceración ($p = 0,038$ y $p = 0,002$, respectivamente), y en FGM ($p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente). Con respecto al subtipo histológico, la sobreexpresión de miR-138-5p se asoció a MN ($p = 0,002$), mientras que la sobreexpresión de miR130b-3p era mayor en los MN y MLA con respecto al resto de subtipos ($p = 0,006$). Asimismo, los melanomas portadores de mutaciones en el promotor del gen *TERT* se asociaron a sobreexpresión de miR138-5p ($p = 0,002$). La regresión no se asoció a la sobreexpresión de ninguno de los miRNAs estudiados. Los miRNAs miR-34a-5p y miR-30b-5p no se asociaron a ninguna de las características clínico-patológicas. Las distintas asociaciones mencionadas se muestran en la figura 58 y la tabla 46.

Resultados

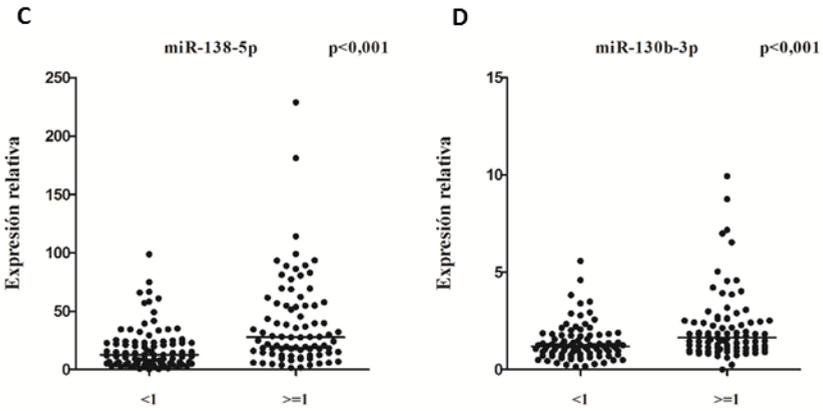
Tabla 46: Expresión media normalizada respecto a piel sana ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de los cuatro miRNAs seleccionados en función de las diferentes variables clínico-patológicas.

Variable	miR-138-5p				miR-130b-3p			miR-30b-5p			miR-34a-5p		
	N	Media	SD	p valor	Media	SD	p valor	Media	SD	p valor	Media	SD	p valor
Subtipo histológico													
LMM	12	15,64	13,80	0,002	1,44	0,73	0,006	1,86	0,81	NS	2,13	0,71	NS
MES	128	26,19	29,40		1,57	1,09		2,71	2,37		2,50	1,80	
MN	23	50,28	42,00		2,45	1,81		3,32	2,68		2,86	2,35	
MLA	11	25,73	24,63		3,00	3,26		2,73	2,85		2,34	1,97	
Índice de Breslow													
4 categorías													
≤1	97	17,69	16,74	<0,001	1,45	1,24	0,001	2,71	2,61	NS	2,34	1,68	NS
1-2	42	37,45	39,52		1,84	1,21		2,42	1,39		2,64	1,80	
2-4	21	50,12	45,33		2,02	1,25		2,70	1,54		2,56	1,64	
>4	19	40,72	29,84		2,82	2,39		3,49	3,35		3,08	2,62	
2 categorías													
≤1	97	17,69	16,74	<0,001	1,45	1,24	0,002	2,71	2,61	NS	2,34	1,68	NS
>1	82	41,24	38,84		2,11	1,60		2,74	2,06		2,72	1,96	
Ulceración													
No	143	26,00	30,54	0,038	1,59	1,04	0,002	2,73	2,38	NS	2,51	1,73	NS
Sí	36	38,14	32,61		2,42	2,38		2,72	2,35		2,53	2,17	
Índice mitótico													
<1	92	18,70	18,50	<0,001	1,37	0,93	<0,001	2,65	2,63	NS	2,36	1,79	NS
≥1	87	39,03	38,15		2,16	1,76		2,80	2,07		2,67	1,85	
Regresión													
No	100	31,92	34,43	NS	1,84	1,54	NS	2,66	2,24	NS	2,39	1,53	NS
Sí	79	24,32	26,50		1,65	1,32		2,81	2,53		2,67	2,13	
Tasa de crecimiento													
No-FGM	148	24,55	25,82	<0,001	1,58	1,17	<0,001	2,64	2,28	NS	2,44	1,71	NS
FGM	31	46,80	45,43		2,61	2,20		3,14	2,75		2,88	2,28	
Mutaciones TERT													
Wt	120	23,68	31,32	0,004	1,67	1,51	NS	2,59	2,14	NS	2,30	1,52	NS
Mutado	54	38,76	29,97		1,95	1,36		2,94	2,79		2,86	2,32	

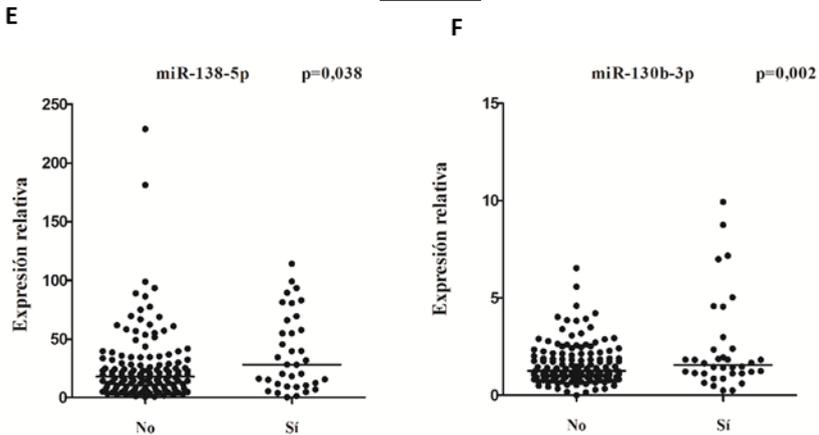
Índice de Breslow



Índice de mitótico



Ulceración



Resultados

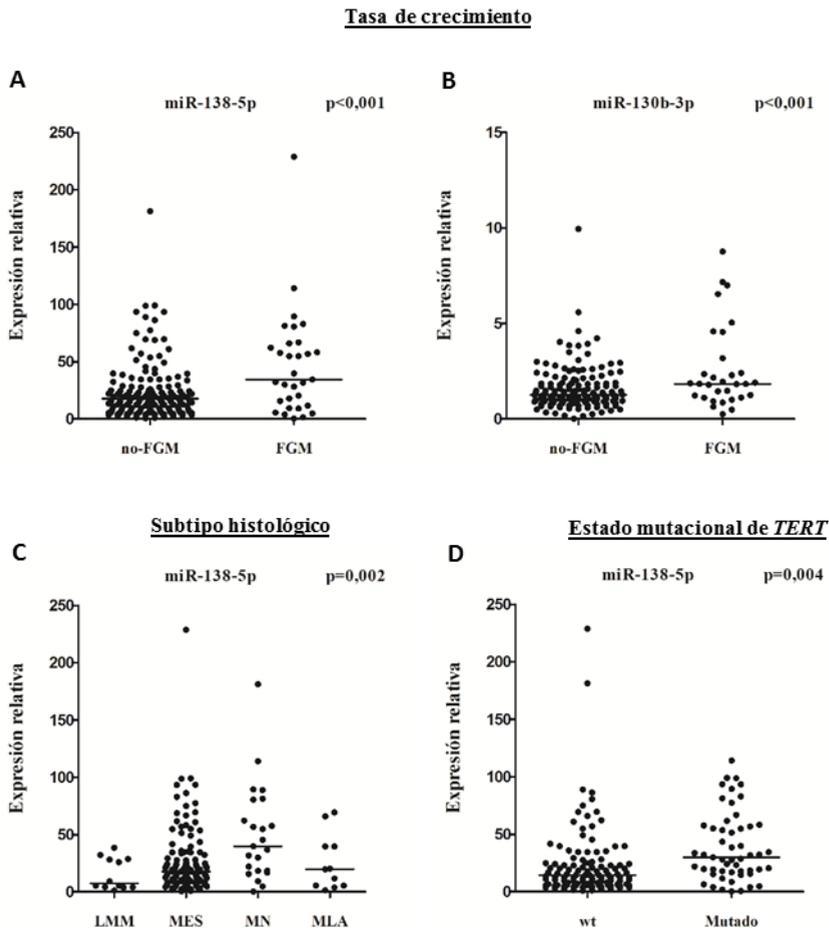


Figura 59: Los gráficos de dispersión muestran los niveles de expresión relativos ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de miR-138-5p y miR-130b-3p en 179 melanomas primarios, y su asociación con las características clínico-patológicas y moleculares. MiR-138-5p y miR-130b-3p se sobreexpresaban en el grupo de melanomas con índice de Breslow superior a 1mm con respecto a los de ≥ 1 mm (A), a melanomas con presencia de mitosis (B), ulcerados (C) y a melanomas de rápido crecimiento (D). La sobreexpresión de miR-138-5p se asoció a los MN y a melanomas portadores de mutaciones en el promotor del gen *TERT* (E).

2.2.4. Estudio de la expresión de los microRNAs validados en nevus melanocíticos y melanomas metastásicos

Se analizó la expresión de los cuatro miRNAs seleccionados en una serie de 9 melanomas metastásicos y 20 nevus melanocíticos adquiridos, y se comparó su expresión con la de los melanomas primarios. Se observaron diferencias significativas en la expresión de miR-34a-5p ($p=0,009$), miR-130b-3p ($p=0,001$), y miR-138-5p ($p=0,019$) entre los tres grupos de estudio, con un aumento progresivo de la expresión desde nevus melanocíticos a metástasis (Figura 60; Tabla 47).

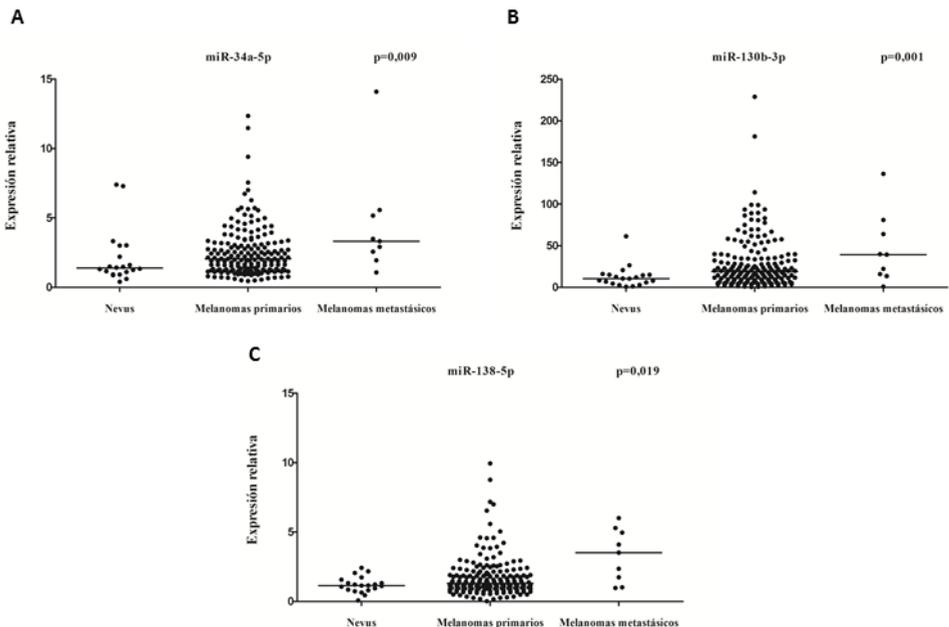


Figura 60: Los gráficos de dispersión muestran los niveles de expresión diferencial de miR-34a-5p (A), miR-130b-3p (B), y miR-138-5p (C) entre nevus melanocíticos, melanomas primarios y melanomas metastásicos.

Resultados

Tabla 47: Expresión media normalizada respecto a piel sana ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de miR-34a-5p, miR-130b-3p, y miR-138-5p en los grupos de estudio.

Grupo de estudio	miR-34a5p				miR-130b-3p			miR-138-5p			miR-30b-5p		
	N	Media	SD	p valor	Media	SD	p valor	Media	SD	p valor	Media	SD	p valor
Nevus	20	2,10	1,96		1,20	0,58		12,71	13,22		2,47	1,72	
MM primarios	179	2,51	1,82	0,009	1,76	1,45	0,001	28,51	31,27	0,019	2,72	2,37	NS
MM metastásicos	9	4,46	3,88		3,32	1,89		45,80	42,35		2,49	1,98	

DISCUSIÓN

1. ESTUDIOS GENÉTICOS

1.1. Diseño del panel de genes y métricas de calidad de la secuenciación masiva

En el presente proyecto de tesis se ha realizado el diseño de un panel de NGS específico de melanoma que ha incluido un total de 35 genes descritos previamente en la literatura. El diseño de este panel supone una nueva aportación a los estudios previos de NGS en melanoma, ya que en la mayoría se habían realizado estudios mediante una aproximación WGS o WES, y en los que se había realizado el estudio de regiones codificantes específicas (*Targeted exome sequencing*), se empleaban paneles comercializados para el estudio del cáncer. Por tanto, este diseño responde a la necesidad ya señalada por algunos autores de desarrollar un panel específico, que incluya no sólo el estudio de genes previamente conocidos en melanoma, sino también genes recientemente descritos que podrían ser relevantes en su patogenia (Griewank *et al.*, 2015).

El diseño que se ha desarrollado incluye el estudio de los denominados genes “accionables”, que son aquellos para los que existe un tratamiento disponible o en vías investigación, o bien genes cuyas mutaciones predicen resistencia a las terapias dirigidas (Chen *et al.*, 2015). Este es el caso no sólo de los genes *BRAF*, *KIT* y *MEK*, para los cuales actualmente disponemos de tratamientos aprobados para el melanoma localmente avanzado y/o metastásico, sino también de otros genes cuyos inhibidores están actualmente en vías de desarrollo en diversos tumores como *PTEN*, *PIK3CA*, *CDK4*, *ERBB4*,

Discusión

ALK, y *MET*. Adicionalmente, cabe destacar que el diseño permite el estudio de genes cuyas mutaciones se han descrito como mecanismos de resistencia a las terapias dirigidas (Turajlic *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2014; Manzano *et al.*, 2016). Así, en el panel se han incluido los genes *NRAS*, *PTEN*, *PIK3CA*, *NF1*, *RAC1*, *HOXD8*, *MITF*, *MEK1*, *MEK2*, *CDK4*, y *GNAQ*, todos ellos relacionados con la resistencia a los inhibidores de BRAF. A este respecto, es importante resaltar la traslación clínica del diseño de este panel, que es de utilidad no sólo para la caracterización molecular de melanomas primarios, sino también para el manejo de melanomas metastásicos, en los que la identificación de una mutación en uno de estos genes podría de ser utilidad a la hora de seleccionar un determinado tratamiento.

Por otro lado, el diseño del presente panel presenta algunas limitaciones que deben ser mencionadas. En primer lugar, en el estudio del gen *TERT* únicamente han podido ser incluidas las regiones codificantes pero no el promotor del mismo, por lo que las mutaciones más frecuentemente reportadas en este gen se han estudiado por una metodología de menor sensibilidad analítica. Esto no difiere de lo reportado en otros estudios en los que, a excepción de los estudios iniciales que describieron dichas mutaciones (Horn *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013), en la gran mayoría (incluyendo el estudio de la TCGA) analizan las mutaciones en el promotor mediante secuenciación de Sanger (tabla 6). Asimismo, el diseño del panel no incluye el estudio del gen *IDH1* e incluye de forma parcial del estudio del gen *NF1*. Esta limitación se debe a que para la selección de genes durante el diseño del panel se revisaron los registros publicados hasta el 1 de diciembre del 2014, fecha anterior a la publicación de la mayor

parte de los estudios en los que se destacaba el papel de ambos genes en el melanoma (Akbari *et al.*, 2015; Krauthammer *et al.*, 2015; Wiesner *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Cirenajwis *et al.*, 2017).

Al igual que en nuestro estudio, los paneles de NGS diseñados por otros autores han sido empleados para el análisis de muestras FFPE (Tabla 5). De hecho, varios estudios han demostrado la aplicabilidad de las muestras FFPE en los análisis mediante NGS (Singh *et al.*, 2013; Tsongalis *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Stiller *et al.*, 2016). Concretamente, en el estudio realizado por Chen *et al.*, se comparan las frecuencias alélicas obtenidas en muestras pareadas de tejido fresco y FFPE, y se demuestra una elevada concordancia entre ambos tipos de muestras. Esto es de especial relevancia, dado que en la práctica clínica diaria la disponibilidad de tejido fresco es muy limitada, sobre todo en el melanoma, en el que para realizar un correcto informe anatomopatológico se requiere el análisis de la totalidad de la muestra.

Una de las mayores ventajas de la NGS con respecto a otras metodologías de secuenciación es su elevada sensibilidad analítica. Así, cabe destacar el elevado LoD (0,5%) demostrado en este estudio mediante diluciones seriadas de dos líneas celulares. Este dato es superior al aportado en estudios previos, que reportan un LoD del 1-10% (Singh *et al.*, 2013; Luthra *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2016). En el estudio realizado por Gao *et al.* realizan diluciones seriadas de dos líneas celulares de páncreas hasta la dilución del 1%, y detectan las mutaciones en los genes *KRAS* y *P53* en todas ellas. A su vez, Luthra *et al.*, realizan diluciones de una línea de cáncer de pulmón y otra de

Discusión

adenocarcinoma de colon con la línea HL-60, e identifican un LoD de hasta el 1,5%. Por el contrario Singh *et al.*, analizan posteriormente diluciones seriadas de estas mismas líneas celulares, y reportan únicamente un LoD del 10%. Es importante señalar que, a diferencia de nuestro análisis, en ninguno de los estudios mencionados se realizan diluciones del 0,5% (1:99) ni 0,05% (1:999). Adicionalmente, al igual que Singh *et al.*, en nuestro estudio hemos demostrado una elevada reproducibilidad de los resultados, al obtener una mínima variación en las frecuencias alélicas obtenidas en dos experimentos independientes. Todos estos datos son importantes para la implementación de la NGS en el diagnóstico de rutina, en el que ocasionalmente se analizan muestras con escasa población tumoral, por lo que resulta necesario disponer de técnicas con elevada sensibilidad y reproducibilidad. No obstante, señalar que a pesar del bajo LoD de la NGS, para su uso en la práctica clínica diaria en muestras parafinadas se aceptan variantes identificadas con una frecuencia alélica (VAF; *variant allele frequency*) del 3-5%, con el fin de evitar falsos positivos o la identificación de variantes presentes en un bajo porcentaje tumoral que tengan una repercusión clínica desconocida (Li *et al.*, 2017; Jennings *et al.*, 2017).

1.2. Alteraciones moleculares en los melanomas primarios.

Frecuencia de mutaciones y asociación a las características clínico-patológicas y supervivencia

Estudios recientes han demostrado que el melanoma es una de las neoplasias con mayor tasa de mutaciones somáticas (Lawrence *et al.*, 2013). A este respecto, destacar que en el 90% de las muestras de nuestra serie se ha identificado al menos una mutación en alguno de los genes estudiados, y en más de la mitad se han detectado dos o más mutaciones. Este dato es superior a lo reportado en el estudio de Siroy *et al.*, en el que sólo un tercio de los melanomas presentaban dos o más mutaciones (Siroy *et al.*, 2015). A esto se le suma que hasta en el 86% de los genes de nuestro panel se ha detectado al menos una mutación. Ambos datos reflejan la utilidad del diseño de un panel específico, en el que la frecuencia de mutaciones identificadas es mayor que al aplicar paneles comerciales que incluyen genes sin relevancia en el melanoma (Griewank *et al.*, 2015).

Acorde a lo descrito en la literatura, en nuestra serie el gen con mayor frecuencia de mutaciones ha sido el gen *BRAF* (50%), siendo las mutaciones más frecuentes las localizadas en el codón V600 (Richtig *et al.*, 2017). Adicionalmente, se han identificado mutaciones en el codón K601, así como en codones reportados con menor frecuencia como L597, L584, G464, y P731. Asimismo, la frecuencia de mutaciones en los genes *NRAS* y *KRAS* coincide con descripciones previas, con cifras del 18% y 3%, respectivamente, y afectando principalmente al codón Q61 (Swick *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2017). En consonancia con otros estudios, la prevalencia de mutaciones en el

Discusión

gen *KIT* ha sido del 4%, con una mutación recurrente en el codón L576. La presencia de mutaciones en este gen se ha asociado a melanomas con índice de Breslow >4mm y ulcerados, aunque este hallazgo no ha previamente sido identificado por otros autores (Jin *et al.*, 2013). Adicionalmente, de acuerdo a lo descrito por Curtin *et al.*, hemos observado distinto perfil de mutaciones en función del patrón de exposición solar. Así, los melanomas portadores de mutaciones en los genes *BRAF* y *NRAS* se localizaban de forma preferente en áreas de exposición solar intermitente, mientras que los melanomas procedentes de áreas de exposición solar crónica y los melanomas acrales, presentaban con mayor frecuencia mutaciones en el gen *KIT*.

Tal y como se ha reportado previamente, en la mayor parte de las muestras se han identificado mutaciones mutuamente excluyentes entre los genes *BRAF* y *NRAS*. De hecho, solo en tres melanomas se han detectado mutaciones concurrentes entre ambos genes, que han sido más frecuentes en melanomas portadores de mutaciones de baja actividad quinasa del gen *BRAF* (fuera del codón V600). Diversos estudios han descrito que las mutaciones en el gen *NRAS* son mutuamente excluyentes con las mutaciones en el gen *BRAF*; sin embargo, esta afirmación parece tener matices, ya que gracias a los recientes estudios de NGS se han descrito mutaciones concurrentes en el gen *NRAS* con mutaciones en el codón 600 del gen *BRAF* en un 1,6% de los melanomas; y hasta en un 18% con mutaciones de baja actividad quinasa del gen (Siroy *et al.*, 2015).

De forma adicional, hemos identificado muestras con dobles mutaciones afectando a los genes *BRAF*, *NRAS*, *KRAS* y *KIT*. Estas

mutaciones concurrentes en el mismo gen han sido escasamente reportadas en la literatura (Jönsson *et al.*, 2009); aun así, cabe la posibilidad de que no hayan sido detectadas por otras metodologías de menor sensibilidad analítica que la NGS. Se ha sugerido que la presencia de mutaciones concurrentes podría suponer una mayor activación de la vía MAPK y, por tanto, su identificación podría tener implicaciones en el pronóstico y tratamiento de los pacientes (Siroy *et al.*, 2015).

En cuanto a la vía PI3K-AKT, un 10% de los melanomas de nuestra serie eran portadores de mutaciones en el gen *PTEN*. Este porcentaje es inferior al 30% de melanomas con pérdida de expresión del gen *PTEN* que se ha descrito previamente (Wu *et al.*, 2003), si bien es cierto que mediante NGS sólo se han estudiado las mutaciones y no así otras alteraciones más frecuentes como las deleciones cromosómicas. Al igual que otros autores, hemos identificado mutaciones concurrentes con los genes *PTEN* y *BRAF* en un alto porcentaje de melanomas (58%) (Goel *et al.*, 2006; Dankort *et al.*, 2009); y en una menor proporción (17%) con el gen *NRAS*, hecho que contrasta con otros estudios en los que describen mutaciones mutuamente excluyentes con este gen (Tsao *et al.*, 2000). A diferencia de otros autores, no hemos detectado ninguna mutación en los genes *PIK3CA* ni *IRS4*, en los que se han descrito mutaciones en melanoma con prevalencias aproximadas del 1-3% (Davies *et al.*, 2008).

Como ya ha sido señalado, una de las características del diseño de nuestro panel de NGS es que ha permitido el análisis de genes recientemente identificados en estudios de WGS/WES. Este es el caso

Discusión

de los genes *PREX2* y *GRIN2A*, en los que acorde a lo descrito previamente, hemos detectado mutaciones a lo largo de toda la región codificante, aunque en prevalencias ligeramente inferiores (14% frente al 23% y 14% frente al 33%, respectivamente) (Berger *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2011). A este respecto, cabe señalar que algunas de las variantes encontradas en nuestro estudio habían sido descritas como mutaciones en estudios previos, sin embargo han sido consideradas variantes benignas tras aplicar los programas de predicción *in silico*. Las mutaciones en el gen *GRIN2A* han resultado más prevalentes en melanomas localizados en áreas fotoexpuestas. Esta asociación no ha sido anteriormente reportada, aunque sí se ha demostrado un mayor número de sustituciones C>T que G>A, sugiriendo la implicación de la exposición solar (Wei *et al.*, 2011).

Adicionalmente, el 8% de los melanomas portaron mutaciones en el gen *NFI*. Esta frecuencia es menor a la identificada en otros estudios (13,1%) (Krauthammer *et al.*, 2015), hecho que podría deberse a que no se ha llevado a cabo el análisis del gen completo, sino que únicamente se han analizado regiones codificantes seleccionadas. Acorde a lo reportado por otros autores, las mutaciones en el gen *NFI* se asociaban a melanomas localizados en áreas de exposición solar crónica (Cirenajwis *et al.*, 2017). A su vez, las mutaciones eran más frecuentes en melanomas con mayor índice de Breslow, ulcerados y con mayor tasa de crecimiento; si bien a diferencia de estudios previos, no hemos identificado asociación con la edad de los pacientes (Krauthammer *et al.*, 2015), ni tampoco con una menor supervivencia (Cirenajwis *et al.*, 2017).

Recientemente se ha reportado el gen *PPP6C* como un nuevo *driver* en melanoma, aunque su implicación no se conoce bien por el momento. En el presente estudio, se han detectado mutaciones en este gen en el 6% de los melanomas, con una mutación recurrente en el *hotspot* R264C en el 3%. Esta cifra es similar a la reportada en el estudio inicial (9% de mutaciones en el gen *PPP6C*, 3% en el codón R264) (Hodis *et al.*, 2012). Sin embargo, contrasta con un estudio posterior en el que analizan 61 melanomas asociados a nevus y no detectan ninguna mutación en el gen *PPP6C*, probablemente debido a la baja sensibilidad analítica del método empleado (secuenciación de Sanger; LoD del 25%) (Shitara *et al.*, 2015).

De acuerdo con otros autores, en el 8% de los melanomas se han detectado mutaciones en el gen *RAC1* (*hotspot* P29S), principalmente en melanomas localizados en áreas fotoexpuestas (Krauthammer *et al.*, 2012). Asimismo, las mutaciones han resultado más frecuentes en FGM. En un estudio reciente, se describe su asociación con melanomas de mayor agresividad (Mar *et al.*, 2014); sin embargo, no se había descrito hasta el momento su asociación con la tasa de crecimiento. Por otro lado, se ha demostrado que la mutación recurrente P29S suprime la respuesta inmune antitumoral (Vu *et al.*, 2015), y también ha sido relacionada con la resistencia a los inhibidores de BRAF (Watson *et al.*, 2014). En nuestra serie, ninguno de los pacientes portadores de la mutación P29S recibió tratamiento sistémico hasta el momento de seguimiento, no pudiéndose establecer asociación con este dato.

De forma adicional, se han descrito como mecanismos de resistencia a las terapias dirigidas mutaciones detectadas en otros

Discusión

genes de nuestro panel. Este es el caso de la mutación P124S en el gen *MAP2K1* (Emery *et al.*, 2009; Nikolaev *et al.*, 2011) y la E207K en el gen *MAP2K2* (Nikolaev *et al.*, 2011), que han sido identificadas en dos melanomas de nuestra serie. Asimismo se ha sugerido el posible papel de las mutaciones en el gen *HOXD8* como posible mecanismo de resistencia (Van Allen *et al.*, 2014). En nuestro estudio hemos identificado una variante no descrita por otros autores (K254R), con predicción patogénica en los programas de predicción *in silico*, pero con implicación desconocida por el momento.

En los últimos años han cobrado especial relevancia las mutaciones en el promotor del gen *TERT* no sólo en el melanoma sino también en otras neoplasias malignas. En nuestra serie, hemos identificado una frecuencia de mutaciones del 30%, que si bien es similar a lo descrito por la gran mayoría de autores (30-40%), cabe destacar que existe gran variabilidad en las cifras reportadas de unas series a otras (Tabla 6). La práctica totalidad de los estudios emplea el mismo método de análisis (secuenciación de Sanger); en consecuencia, la variabilidad en las prevalencias pudiera probablemente deberse al tipo de muestra analizada (FFPE vs tejido fresco) y al diferente origen de la misma (primarios vs metastásicos), incluso dentro del mismo estudio. Una de las diferencias principales de nuestra serie con respecto a otros estudios con mayor frecuencia de mutaciones es que éstos analizan en su mayoría muestras de melanoma metastásico. En la serie de Griewank *et al.*, donde se reporta una frecuencia de mutaciones en los primarios similar a la nuestra (36,6%), asciende a 50,3% en los melanomas metastásicos (Griewank *et al.*, 2014). Se ha descrito que las mutaciones en el

promotor del gen *TERT* son un evento inicial en la progresión neoplásica de las lesiones melanocíticas (Shain *et al.*, 2015; Bell *et al.*, 2016); y, consecuentemente, no debiera detectarse una mayor frecuencia de mutaciones en las metástasis. Una posible explicación a esta discrepancia entre primarios y metastásicos podría ser el mayor porcentaje de células tumorales en las muestras metastásicas, que aumentarían la probabilidad de detectar las mutaciones mediante secuenciación de Sanger. De hecho, cabe destacar que en nuestra serie identificamos la mutación en un melanoma metastásico en el que no habíamos detectado la mutación en el tumor primario, probablemente debido a esta diferencia en el porcentaje de población tumoral.

Por otro lado, dentro de los estudios con melanomas primarios, las muestras analizadas en otras series presentan características que difieren de nuestra serie en varios aspectos. La serie aportada por el grupo de la TCGA recoge 67 melanomas primarios, de los cuales en el momento del diagnóstico inicial el 89% eran T4 (mediana de Breslow de 7mm), 86% presentaban ulceración y 91% ≥ 1 mitosis (Akbani *et al.*, 2015). Todas estas características histopatológicas se han asociado a la presencia de mutaciones en el promotor, lo que podría explicar esa mayor frecuencia de mutaciones con respecto a nuestra serie (64,4% vs 30%), donde la mayoría de las muestras tienen un índice de Breslow < 1 mm (56,2%), y sólo el 20% y el 46,7% presentan ulceración y mitosis, respectivamente. De forma adicional, en la serie descrita por Hugdahl *et al.* se detecta una prevalencia de mutaciones del 68% en melanomas primarios; sin embargo, únicamente incluyen melanomas del subtipo histológico nodular (Hugdahl *et al.*, 2017), que

Discusión

también se han asociado con mayor frecuencia a la presencia de mutaciones en distintas series (Heidenreich *et al.*, 2014; Pópulo *et al.*, 2014).

En consonancia con otros estudios, el 85% de las mutaciones se han detectado en las posiciones c.1-146 (57%) y c.1-124 (28%), mientras que las mutaciones en las posiciones c.1-124/-125 y c.1-138/-139 han sido menos frecuentes (5% y 8%, respectivamente). Adicionalmente, en uno de los melanomas se ha detectado la mutación c.1-57, asociada a melanoma familiar, sin embargo la paciente no presentaba antecedentes personales ni familiares de melanoma.

Acorde a lo descrito por otros autores, en nuestra serie las mutaciones en el promotor del gen *TERT* se han asociado a melanomas de localización no acral, del subtipo histológico nodular, con alta tasa de crecimiento, alto índice de Breslow, presencia de ulceración y mitosis, estadio tumoral avanzado y presencia de recaídas locorregionales y/o a distancia (Heidenreich *et al.*, 2014a; Pópulo *et al.*, 2014; Griewank *et al.*, 2014; Nagore *et al.*, 2016a). Por el contrario, a diferencia de otras series, no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa con la edad de los pacientes.

De forma adicional, hemos identificado que los melanomas sin regresión histológica se asocian a mutaciones en el promotor del gen *TERT*. Este hallazgo, no reportado previamente en la literatura, concuerda con el hecho de que los melanomas con regresión suelen ser melanomas finos (<1mm), sin ulceración, y del subtipo histológico MES (Ribero *et al.*, 2013), que son características que con menor

frecuencia se asocian a las mutaciones en el gen *TERT*. Por otro lado, este hallazgo también podría estar en relación con la hipótesis de la disfunción telomérica como mecanismo patogénico para explicar el fenómeno de regresión (Bastian *et al.*, 2003). Según esta hipótesis, tras una serie de divisiones celulares las células tumorales acortarían sus telómeros y entrarían en una fase denominada *crisis*, desencadenada por la presencia de aberraciones cromosómicas, y caracterizada por la apoptosis en un gran número de células. Durante esta fase, aquellas células tumorales con capacidad para estabilizar sus telómeros gracias a la telomerasa (o gracias al mecanismo ALT-*alternative lengthening of telomeres*) escaparían de la *crisis*, mientras que las células sin telomerasa entrarían en apoptosis consecuencia de la inestabilidad genómica.

Esta hipótesis no sería contraria al origen inmunológico de la regresión espontánea, sino que la acción del sistema inmune sería un mecanismo complementario al acortamiento de los telómeros. Según esto, los cuerpos apoptóticos representarían el estímulo antigénico que atraería la respuesta del sistema inmunológico, dando lugar a ese infiltrado inflamatorio que caracteriza histológicamente la fase temprana del fenómeno de regresión. A nivel experimental esta hipótesis se apoya en los resultados de Pathak *et al.*, que describieron la ausencia de actividad telomerasica y el acortamiento de los telómeros en melanomas porcinos con presencia de regresión (Pathak *et al.*, 2000). Adicionalmente, varios trabajos realizados en lesiones melanocíticas han revelado una menor actividad telomerasica en melanomas con regresión (Rudolph *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2006). Asimismo, varios estudios han descrito la ausencia de actividad

Discusión

telomérica en un subtipo de neuroblastoma de buen pronóstico (estadio IVS) caracterizado por la regresión espontánea (Hiyama *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1997). Todos estos hallazgos sugieren el posible papel de la telomerasa en la regresión espontánea del melanoma. Por tanto, dado que las mutaciones en el promotor del gen *TERT* se asocian a una mayor expresión de telomerasa; la menor expresión de telomerasa en los melanomas sin mutaciones podría ser un mecanismo alternativo que explicara la presencia del fenómeno de regresión espontánea en este subgrupo de melanomas.

Diversos autores han demostrado que las mutaciones en el promotor de *TERT* representan un factor pronóstico independiente en el melanoma (Pópulo *et al.*, 2014; Griewank *et al.*, 2014; Nagore *et al.*, 2016b). Estos estudios han muestran que los melanomas portadores de mutaciones presentan menores SLE y SG que los melanomas *wt*, independientemente de sus características clínico-patológicas. Los resultados de nuestra serie muestran que la presencia de mutaciones se asocia a una menor SLE, sin embargo no hemos identificado asociación con la SG. Esta ausencia de correlación con la SG podría deberse al escaso número de pacientes en los que se produjo éxitus en nuestra serie (4,8%); hecho que no llama la atención dado que la mayoría de los melanomas presentaban características clínico-patológicas de buen pronóstico. Por el contrario, tres estudios recientes no han demostrado asociación de las mutaciones con la supervivencia (Ekedahl *et al.*, 2016; Hugdahl *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2017); si bien cabe mencionar que los tres estudios presentan ciertas particularidades que no los hace comparables a los demás estudios publicados. Uno de ellos sólo analizaba melanomas metastásicos

(Ekedahl *et al.*, 2016), otro únicamente incluía melanomas del subtipo histológico nodular (Hugdahl *et al.*, 2017), y en el último se analizaba una cohorte asiática en la que predominaban los melanomas acrales y mucosos (Bai *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en consonancia con otros autores, hemos identificado un 40,5% de muestras portadoras del polimorfismo *rs2853669* (Rachakonda *et al.*, 2013). La presencia de este polimorfismo de forma aislada no se ha asociado a ninguna de las características clínico-patológicas ni tampoco a la supervivencia. Sin embargo, estratificando los melanomas en función del polimorfismo, sí que hemos observado que las asociaciones de las mutaciones en el promotor de *TERT* con las características de mayor agresividad (índice de Breslow, ulceración y mitosis) sólo se mantenían en los melanomas no portadores del polimorfismo. Asimismo, la reducción significativa de la SLE únicamente se mantenía en este subgrupo de melanomas. Estos resultados están en la misma línea de los reportados en otros estudios en cáncer de vejiga, glioblastoma y melanoma, que han sugerido una modificación del efecto de las mutaciones secundario a la presencia del polimorfismo. Se ha descrito que la presencia del polimorfismo modifica los sitios de unión en la región proximal del promotor, impidiendo la unión de factores de transcripción de la familia ETS. Nagore *et al.* han demostrado que los melanomas portadores de mutaciones se asocian a una mayor tasa de crecimiento, siendo la fuerza de esta asociación mayor en ausencia del polimorfismo (Nagore *et al.*, 2016a). Por otro lado, diversos estudios han reportado una menor supervivencia asociada a las mutaciones sólo

Discusión

en ausencia del polimorfismo (Rachakonda *et al.*, 2013; Simón *et al.*, 2015; Nagore *et al.*, 2016b; Batista *et al.*, 2016).

Finalmente, mencionar el gen *IDHI* en el que hemos identificado mutaciones en el 1% de los melanomas de nuestra serie. Resulta difícil comparar la frecuencia observada en nuestra serie con la de otros autores, dado que son escasos los estudios que han analizado las mutaciones en el melanoma, y los que existen, reportan cifras que varían del 1,1 al 13% (Tabla 7). No hemos identificado asociación con ninguna característica clínico-patológica, si bien los dos melanomas portadores de mutación estaban localizados en áreas fotoexpuestas; presentaban características clínico-patológicas de mayor agresividad (mayor edad, Breslow >2mm, ulceración, mitosis, ausencia de regresión); así como alteraciones moleculares asociadas a mal pronóstico (mutaciones en el promotor del gen *TERT* y metilación en el gen *RARB*). La asociación de las mutaciones en el gen *IDHI* con las características clínico-patológicas de los melanomas no ha sido objeto de análisis en ningún estudio previo, aunque sí se ha señalado la inducción de estas mutaciones por la exposición solar dada la transición C>T (Hodis *et al.*, 2012; Krauthammer *et al.*, 2015). Paralelamente se ha descrito la asociación de las mutaciones en el gen *IDHI* a un fenotipo hipermetilador (Noushmehr *et al.*, 2010; Akbani *et al.*, 2015). La presencia de estas mutaciones conlleva un catabolismo adicional de α -KG a D-2-hydroxyglutarato (D-2HG), dando lugar a niveles elevados de D-2HG (Dang *et al.*, 2009). Este metabolito tiene la capacidad de inhibir las enzimas α -KG dependientes que regulan la actividad epigenética, como es el caso de las demetilinasas de la familia TET (*ten-eleven traslocation*), cuya

inhibición conlleva una hipermetilación del ADN (Xu *et al.*, 2011). Con respecto a nuestra serie, no se ha podido establecer la asociación con ese fenotipo hipermetilador dada la baja frecuencia de mutaciones, aunque cabe destacar que los dos melanomas portadores de mutación en el gen *IDHI* presentaban hipermetilación en tres genes.

1.3. Clasificación genómica de los melanomas primarios

En el presente estudio se ha establecido una clasificación de los melanomas primarios en base a los subtipos recientemente reportados por el grupo de la TCGA (Akbani *et al.*, 2015). Acorde a lo descrito, el subtipo más prevalente fue el de *BRAF*, seguido por los subtipos RAS y NF1. Sin embargo, dada la presencia de mutaciones concurrentes entre los genes *BRAF*, *RAS* (*NRAS* y *KRAS*) y *NF1*, no ha sido posible establecer una distinción clara entre estos tres subtipos. Por ello, teniendo en cuenta estos subtipos de forma conjunta, el 28% de los melanomas de nuestra serie han sido clasificados como triple-*wt*. Este porcentaje es superior a lo reportado por el grupo de la TCGA (6%); por un lado, debido a una menor frecuencia de mutaciones en los genes de la familia *RAS* (17% vs 28%), y también a la menor frecuencia de melanomas portadores de mutaciones en el gen *NF1* (8% vs 14%). Por otro lado, no podemos descartar que esta diferencia también se deba a las diferentes características histopatológicas de los melanomas de nuestra serie con respecto a los de la TCGA, ya señalado anteriormente.

Acorde a lo descrito por la TCGA, los melanomas del subtipo *NF1* eran portadores de un mayor número de mutaciones comparado

Discusión

con los otros subtipos. Por el contrario, a diferencia de la TCGA donde encontraban baja prevalencia de mutaciones en el promotor de *TERT* en el subtipo triple-*wt* (6,2%), en nuestra serie no hemos identificado diferencias en la frecuencia de mutaciones en el promotor de *TERT* en los diferentes subtipos, siendo del 18,9% en el subtipo triple-*wt*. Esta discrepancia podría deberse a que algunos de los melanomas del subtipo triple-*wt* probablemente quedarían englobados en el subtipo *NFI* si hubiera sido estudiada toda la región codificante de dicho gen.

1.4. Alteraciones moleculares en los melanomas metastásicos

La presencia de homo/heterogeneidad intertumoral es un tema sujeto a controversia en los diferentes estudios publicados al respecto. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito previamente por otros autores, que analizan el estado mutacional de los genes *BRAF* y *NRAS* en muestras pareadas, y demuestran tasas de concordancia del 100% (Boursault *et al.*, 2013; Menzies *et al.*, 2014; Riveiro-Falkenbach *et al.*, 2015; Uguen *et al.*, 2016). Concretamente, Riveiro-Falkenbach *et al.* analizan las mutaciones en el gen *BRAF* en 140 muestras pareadas mediante PCR alelo-específica (*The cobas*® 4800 *BRAF* V600 test) e inmunohistoquímica; y al igual que en nuestra serie, identifican un único caso inicialmente catalogado como discordante debido a la presencia de dos melanomas primarios (Riveiro-Falkenbach *et al.*, 2015). Por el contrario, otros estudios han identificado heterogeneidad intertumoral en cifras que varían del 6-44% de los melanomas (Yancovitz *et al.*, 2012; Colombino *et al.*, 2012; Heinzerling *et al.*, 2013; Saint-Jean *et al.*, 2014; Bradish *et al.*, 2015; Yaman *et al.*,

2016). Algunas de las hipótesis propuestas para explicar esta discrepancia entre los tumores primarios y metastásicos, es la presencia de diferentes clones dentro de un mismo tumor primario que genera metástasis con diferentes perfiles mutacionales; o bien la evolución clonal, con cambios en el perfil molecular mediante la adquisición o pérdida de mutaciones durante la progresión del melanoma (Varada *et al.*, 2015; Riveiro-Falkenbach *et al.*, 2017). Adicionalmente, Riveiro-Falkenbach *et al.* han sugerido que la heterogeneidad intertumoral identificada por otros autores podría deberse a problemas en la metodología molecular empleada, ya sea por el empleo de métodos con baja sensibilidad analítica, métodos que analizan únicamente la mutación V600E, o bien a muestras con baja celularidad tumoral. A este respecto, son escasos los estudios en los que se ha analizado la homo/heterogeneidad intertumoral mediante métodos de alto rendimiento, como la NGS.

Goswami *et al.* analizan por NGS el perfil mutacional de 265 muestras pareadas primario-metástasis de diferentes tipos de neoplasias empleando el *Ampliseq Cancer Panel*. Incluyen un total de 20 melanomas en los que, al igual que en nuestra serie, identifican homogeneidad intertumoral para las mutaciones en los genes *BRAF* y *NRAS* en todas las muestras. Asimismo, describen tres melanomas con mutaciones discordantes en otros genes entre el primario y la metástasis: en dos casos detectan mutaciones en el primario que no están presentes en la metástasis (un caso con la mutación p.Val14Ile en el gen *KRAS* y otro con la mutación p.Met541Leu en el gen *KIT*), y en un caso detectan en la metástasis una mutación no detectable en el tumor primario (la mutación p.Ser45Pro en el gen *CTNNB1*). A su

Discusión

vez, Mirafior *et al.* analizan ocho muestras pareadas de melanoma mediante el *Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2*, e identifican cuatro casos discordantes en los que detectan nuevas mutaciones en las metástasis en los genes *BRAF*, *CDKN2A*, *ATM* y *PIK3CA* (Mirafior *et al.*, 2017). En consonancia con Goswami *et al.*, la mayoría de las muestras de nuestra serie presentaban un perfil mutacional concordante entre el primario y la metástasis; sin embargo, en tres metástasis hemos identificado mutaciones en el gen *PTEN* que no estaban presentes en el tumor primario; y de forma adicional, en una metástasis hemos detectado una mutación en el gen *GNAQ*.

La detección de estas mutaciones adicionales en el tumor metastásico podría tener implicaciones en el manejo de los pacientes, ya que podrían representar mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos a las terapias dirigidas. En este sentido, cabe destacar que diversos autores han señalado el papel de las mutaciones en el gen *PTEN* como mecanismos de resistencia a los inhibidores de BRAF (Manzano *et al.*, 2016). Recientemente, Turajlic *et al.* han descrito un caso de resistencia intrínseca a inhibidores de BRAF consecuencia de una doble activación de las vías MAPK y PI3K/AKT, mediante mutaciones en los genes *GNAQ* y *PTEN* (Turajlic *et al.*, 2014). Con respecto a nuestra serie, el paciente portador de mutaciones en los genes *PTEN* y *GNAQ* no recibió tratamiento durante el periodo de seguimiento; sin embargo, uno de los pacientes portadores de mutación en el gen *PTEN* recibió tratamiento con inhibidores de BRAF y MEK y demostró resistencia intrínseca al tratamiento. Dicha resistencia podría explicarse por la doble activación de las vías MAPK

y PI3K/AKT mediante la mutación p.ValV600Glu en el gen *BRAF*, y la p.Arg47Lys en el gen *PTEN*.

Actualmente, en la práctica clínica asistencial uno de los factores a tener en cuenta para la administración de una terapia dirigida es la determinación de las mutaciones en el gen *BRAF*. A la vista de nuestros resultados, esta determinación podría realizarse tanto en el tumor primario como en el metastásico, ya que ambos presentarían el mismo estado mutacional para dicho gen. Sin embargo, la posibilidad de que existan múltiples melanomas primarios, así como la presencia de nuevas mutaciones en el tumor metastásico, pone de manifiesto la necesidad de emplear la metástasis en los estudios moleculares. En este sentido, queremos destacar la aplicación de un panel específico de melanoma en la muestra metastásica, ya que permitiría no sólo el análisis de las mutaciones en el gen *BRAF*, sino también la detección de nuevas mutaciones que podrían representar mecanismos de resistencia, y por tanto sería de utilidad para la identificación de los pacientes candidatos a tratamiento.

Con respecto al promotor del gen *TERT*, son escasos los estudios en lo que se ha analizado la concordancia de mutaciones entre melanomas primarios y metastásicos. Cabe destacar que a pesar de lo mencionado anteriormente de que las mutaciones en el promotor del gen *TERT* se han descrito como un evento inicial (Shain *et al.*, 2015; Bell *et al.*, 2016), no todos los estudios identifican homogeneidad intertumoral entre el primario y la metástasis. Heidenreich *et al.* estudian seis casos reportando concordancia en todos los casos pareados (Heidenreich *et al.*, 2014). Por el contrario, Hugdahl *et al.*

Discusión

estudian 58 muestras pareadas e identifican un total de 14 casos discordantes (24%); cuatro casos en los que, al igual que en nuestra serie, detectan la mutación en la metástasis pero no en el tumor primario, y 10 en los que la mutación sólo está presente en el melanoma primario, de los cuales en cuatro identifican la mutación cuando reanalizan diferentes partes de la metástasis (Hugdahl *et al.*, 2017). A su vez, Yang *et al.* describen una baja concordancia ($\kappa=0.33$) en 41 casos pareados (Yang *et al.*, 2018). Adicionalmente, Ofner *et al.* analizan 40 melanomas primarios y 75 metastásicos y no identifican diferencias significativas en la prevalencia de mutaciones entre primarios y metastásicos, si bien no estudian ningún caso pareado (Ofner *et al.*, 2017).

2. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS

2.1. Detección de metilación en el promotor de genes supresores tumorales

En el presente proyecto se ha analizado la metilación en la región promotora de 24 TSGs mediante MS-MLPA. El MS-MLPA es una metodología que ha demostrado ser de utilidad en la práctica clínica diaria, ya que permite el empleo de muestras FFPE, y lleva a cabo el análisis de metilación en múltiples genes en una sola reacción. Diversos estudios han reportado la utilidad de este método para el análisis de la metilación (Nygren *et al.*, 2005; Takata *et al.*, 2007; Erlandson *et al.*, 2008; Huynh *et al.*, 2012; Murria *et al.*, 2014). En dichos estudios, se establece un LoD del 10% y se considera ruido de

fondo la metilación identificada por debajo de este porcentaje, pero sin realizarse en ninguno de ellos un análisis de sensibilidad analítica. En este sentido, en el presente proyecto se ha realizado un análisis de sensibilidad que ha corroborado el LoD previamente descrito, al demostrarse la capacidad de la técnica de detectar metilación con todas las sondas cuando la región promotora del estándar se encuentra metilada al 10%. Adicionalmente, a pesar de que hemos establecido un LoD del 10%, también se ha podido demostrar que la metodología es capaz de detectar metilación con la mayoría de las sondas cuando existe metilación únicamente en un 2,5% del ADN estudiado. Este dato es relevante, ya que pone de manifiesto la utilidad del MS-MLPA en las muestras empleadas en el diagnóstico molecular rutinario, en las que ocasionalmente el porcentaje de celularidad tumoral puede ser bajo.

De acuerdo con otros autores, la metilación en el promotor de los genes *RARB* y *PTEN* ha resultado frecuente en los melanomas de nuestra serie (Schinke *et al.*, 2010; Marzese *et al.*, 2014). Con respecto al gen *RARB*, cabe destacar que las cifras de metilación son ligeramente inferiores a las descritas en algunos estudios previos, probablemente debido a las distintas características clínico-patológicas de los melanomas incluidos. Concretamente, en la serie reportada por Hoon *et al.* el 70% de los tumores primarios presentan metilación en el gen *RARB*, sin embargo, estos autores analizan un escaso número de tumores primarios (n=20) y no se especifican las características clínico-patológicas de los mismos (Hoon *et al.*, 2004). En contraste, Furuta *et al.* analizan la metilación en una serie corta de melanomas primarios (n=4) y metastásicos (n=21), y demuestran un porcentaje de

Discusión

metilación de *RARB* similar al obtenido en nuestro estudio (20%) (Furuta *et al.*, 2004). Por otro lado, hemos identificado un alto número de melanomas con metilación en el promotor del gen *PTEN*. Esta cifra también es comparable a la identificada por Furuta *et al.*, que describen metilación en un 23% de las líneas celulares estudiadas (Furuta *et al.*, 2004). Sin embargo, difiere de la reportada por Lahtz *et al.* que describen un 60% de metilación en 230 melanomas cutáneos; aunque de nuevo cabe destacar que es una serie con características distintas a la nuestra, ya que incluye una cohorte de melanomas con una mediana de índice de Breslow de 1,9mm (Lahtz *et al.*, 2010). Adicionalmente, en consonancia con el estudio de Marzese *et al.*, hemos identificado metilación concomitante en los genes *RARB* y *PTEN* en el 15% de los melanomas estudiados (Marzese *et al.*, 2014). Esta metilación concomitante podría identificar un subgrupo de melanomas con características moleculares comunes, en los que el silenciamiento génico de ambos genes tuviera un papel en el desarrollo y progresión del melanoma.

En cuanto al gen *RASSF1*, sólo un 6% de los melanomas de nuestra serie presentaban metilación en su promotor. Esta cifra contrasta con la reportada en el estudio de Tanemura *et al.* (28.6%), si bien todos los melanomas incluidos en su estudio correspondían a melanomas en estadios avanzados (Tanemura *et al.*, 2009). Acorde a lo descrito en estudios previos, otros genes con un porcentaje considerable de metilación en los melanomas de nuestra serie han sido *APC*, *CDH13*, *ESR1* y *CDKN2A* (Gonzalvo *et al.*, 1997; Worm *et al.*, 2004; Marzese *et al.*, 2014).

Son escasos los estudios publicados en los que se analice la asociación entre la metilación y las características clínico-patológicas de los melanomas. A este respecto, los resultados del presente estudio demuestran la asociación de la metilación y un fenotipo de mayor agresividad. Por un lado, hemos detectado mayor frecuencia de metilación en pacientes de mayor edad. Esta asociación ya ha sido previamente descrita en las células de la mucosa intestinal, en las que la metilación asociada a la edad es un factor que contribuye al desarrollo de cáncer de colon (Ahuja *et al.*, 1998; Issa *et al.*, 2001). Por otro lado, hemos demostrado asociación entre la metilación y características histopatológicas de mal pronóstico como el Breslow, la ulceración y las mitosis. La asociación con el índice de Breslow ha sido previamente reportada en la serie de Hoon *et al.*, que identifican mayor metilación en el gen *RARB* en los melanomas con mayor espesor tumoral (Hoon *et al.*, 2004). Asimismo, esta asociación se ha descrito en el estudio realizado por Thomas *et al.*, en el que analizan 47 melanomas primarios y, al igual que en nuestra serie, identifican correlación entre el fenotipo hipermetilador y los melanomas con mayor índice de Breslow y ulceración (Thomas *et al.*, 2014). Sin embargo, al contrario que en nuestros resultados, estos autores describen una asociación inversa entre la metilación y los melanomas con mayor índice mitótico. Otros autores no han encontrado ninguna asociación entre la metilación y el índice mitótico (Gao *et al.*, 2013).

Además, en consonancia con otros estudios, en los melanomas localizados en áreas acrales hemos identificado mayor metilación, y una reducción significativa en el número de mutaciones frente a otras localizaciones (De Araújo *et al.*, 2015; Hayward *et al.*, 2017). Los

Discusión

melanomas acrales representan un subgrupo de melanomas con características diferenciales, ya que generalmente se diagnostican en pacientes de mayor edad y no se relacionan con la exposición solar (Phan *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que estos melanomas presentan un perfil molecular diferente al resto de los melanomas, caracterizado por un menor número de mutaciones y mayor prevalencia de otras alteraciones moleculares (Hayward *et al.*, 2017).

Paralelamente, los resultados de nuestra serie demuestran el impacto pronóstico de la metilación en el promotor de TSGs. Por un lado, hemos identificado mayor prevalencia de metilación en los genes *RARB*, *PTEN* y *CDH13* en melanomas con estadio tumoral avanzado. Esta asociación de la metilación con el estadio tumoral ha sido previamente descrita por Sigalotti *et al.*, que identifican hipermetilación en una firma de 17 genes en melanomas con estadio tumoral IIIC (Sigalotti *et al.*, 2012). Asimismo, también se ha descrito en relación a los genes *RASSF1* y *PTEN*, en los que se ha demostrado mayor metilación en melanomas con estadio III/IV (Tanemura *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2016). Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, en la serie de Tanemura *et al.* se reporta la metilación en el gen *RARB* como un evento inicial, al identificar mayor prevalencia de metilación en tumores con estadios iniciales (Tanemura *et al.*, 2009).

Por otro lado, nuestros resultados demuestran la asociación de la metilación en los genes *RARB*, *PTEN* y *CDH13* con una reducción de la SLE y SG. Esta asociación con *RARB* se ha descrito en un estudio realizado por Mori *et al.*, en el que identifican menor tasa de

SG en pacientes con hipermetilación en suero en los genes *RARB*, o *RASSF1*, o en ambos genes conjuntamente (Mori *et al.*, 2005). Adicionalmente, dos estudios recientes han demostrado el impacto pronóstico del gen *PTEN*. Lahtz *et al.* identifican metilación del gen *PTEN* en el 60% de los melanomas, y demuestran su asociación a una menor SG (Lahtz *et al.*, 2010). Asimismo, Roh *et al.* analizan 392 melanomas procedentes de dos cohortes (una coreana y la de la TCGA) e identifican la metilación del gen *PTEN* como un factor pronóstico independiente asociado a menor SLE y SG (Roh *et al.*, 2016). Con respecto al gen *CDH13*, a diferencia de otros tumores no hemos encontrado ningún estudio previo en melanoma en el que se demuestre su valor pronóstico. En cáncer de vejiga se ha demostrado su asociación a tumores de alto grado, estadio avanzado, recurrencia tumoral y mal pronóstico (Lin *et al.*, 2011). En contraste con otros estudios, nuestros resultados no han demostrado asociación entre la metilación en el gen *RASSF1* y el estadio tumoral avanzado o la supervivencia (Tanemura *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2005). Esta discrepancia probablemente sea debida al bajo porcentaje de melanomas con metilación en este gen, y a su vez al menor número de melanomas en estadios avanzados incluidos en nuestra serie.

Como se ha mencionado, en el análisis univariante hemos demostrado menores tasas de supervivencia en melanomas con metilación en los genes *RARB*, *PTEN* y *CDH13*. Sin embargo, en el análisis multivariante dicha asociación únicamente permanece significativa con el gen *RARB*, que junto con el Breslow y la ulceración son factores independientes predictores de menor SLE y SG. En este análisis, la metilación no ha demostrado ser superior al

Discusión

Breslow y la ulceración, que son parámetros histológicos con valor pronóstico bien establecido, ambos incluidos en la última clasificación de la AJCC (Gershenwald *et al.*, 2017). Por ello, a la vista de nuestros resultados y acorde a lo sugerido por otros autores, el análisis de la metilación no debería incluirse como un único factor pronóstico en la práctica clínica habitual (Lahtz *et al.*, 2010), sino que las alteraciones epigenéticas podrían representar biomarcadores pronósticos que proporcionen información adicional a los parámetros histológicos convencionales.

Finalmente, hemos estudiado la posible asociación de la metilación en el promotor de los genes estudiados con el estado mutacional de los genes *BRAF*, *NRAS*, *TERT* e *IDHI*. Así, en consonancia a lo reportado por otros autores, no hemos identificado correlación entre la metilación y la presencia de mutaciones en los genes *BRAF* y *NRAS* (Tellez *et al.*, 2009; Lahtz *et al.*, 2010; Lauss *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2015). Como ya se ha mencionado, se ha descrito la asociación de un fenotipo hipermetilador con las mutaciones en el gen *IDHI* (Noushmehr *et al.*, 2010; Akbani *et al.*, 2015). Esta asociación no ha podido ser establecida en nuestra serie dada la baja frecuencia de mutaciones en dicho gen, aunque es relevante mencionar que los dos melanomas portadores de la mutación R132C presentaban hipermetilación en tres de los genes estudiados. De forma adicional, en nuestro estudio se ha descrito por primera vez la asociación entre las mutaciones en el promotor del gen *TERT* y la metilación en los genes *RARB* y *RASSF1*. Esta asociación podría tener implicaciones en el manejo clínico de los pacientes, ya que ambas alteraciones moleculares están asociadas a mal pronóstico, y podrían

emplearse de forma combinada para la estratificación de pacientes en base al pronóstico.

2.2. Estudio de expresión de microRNAs

El análisis de expresión mediante *arrays* ha identificado cuatro miRNAs diferencialmente expresados en los melanomas en base a sus características clínico-patológicas de mal pronóstico y al estado mutacional del gen *TERT*.

Uno de los miRNAs identificados es miR-138-5p, que recientemente se ha descrito como un supresor tumoral en diversas neoplasias malignas como el cáncer de tiroides, de esófago, de ovario, de colon, de vejiga, de pulmón, de mama y el osteosarcoma (Mitomo *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012; Yen *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). Concretamente, se ha demostrado que inhibe la proliferación celular, induce apoptosis, e impide la invasión y formación de metástasis mediante su unión a múltiples genes diana (Sha *et al.*, 2017). Se ha propuesto la posible utilidad terapéutica de este miRNA tras demostrar que incrementa la sensibilidad a agentes quimioterápicos en cáncer de pulmón, osteosarcoma, y leucemia (Jin *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2017). Asimismo, se ha sugerido su papel como agente inmunoterapéutico dada su capacidad de disminuir la expresión de moléculas reguladoras de la respuesta inmune como *FOXP3*, *CTLA-4*, *PD-1* y *PD-L1* (Wei *et al.*, 2016; Zhao *al.*, 2016).

Discusión

Con respecto al melanoma, Chen *et al.* han reportado menor expresión de miR-138-5p en una línea celular de melanoma comparado con melanocitos normales, y han demostrado su capacidad de inhibir la proliferación, invasión y glicolisis mediante su unión al gen *HIF-1 α* (Chen *et al.*, 2016). Asimismo, recientemente Meng *et al.* han identificado infraexpresión de este miRNA en la línea celular A2058 y en pacientes con melanoma comparado con controles sanos, y de nuevo han demostrado inhibición de la proliferación celular e inducción de apoptosis mediante la interacción con la vía PI3K/AKT (Meng *et al.*, 2017).

Los resultados aquí obtenidos demuestran un incremento progresivo de la expresión de miR-138-5p desde nevus melanocíticos a melanomas metastásicos. Adicionalmente, hemos identificado la sobreexpresión de este miRNA en melanomas con alta tasa de crecimiento, subtipo histológico nodular, mayor índice de Breslow y presencia de mitosis. Estos datos contrastan con los reportados en los estudios de Chen *et al.* y Meng *et al.*, aunque cabe destacar que no son del todo comparables, ya que por un lado en nuestra serie no hemos comparado la expresión de miR-138-5p con controles sanos; y por otro lado en los estudios anteriormente mencionados se analiza su expresión en una sola línea celular de melanoma y en células circulantes procedentes de cinco pacientes con melanoma. Paralelamente, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Larsen *et al.*, que han identificado mayor expresión de miR-138-5p en melanoma conjuntival comparado con muestras de conjuntiva sana, y a su vez demuestran mayor expresión en melanomas con mayor espesor tumoral (Larsen *et al.*, 2016). Además, nuestros resultados

concuerdan con los obtenidos en un estudio previo en el que han demostrado mayor expresión de miR-138-5p en los MN comparados con los MES (Poliseno *et al.*, 2012). No hemos encontrado ninguna referencia previa acerca de la relación de miR-138-5p con la tasa de crecimiento ni el índice mitótico, sin embargo, cabría esperar una relación inversa dada la capacidad del miRNA de inhibir la proliferación e invasión celular. El hecho de que en nuestra serie hayamos identificado mayor expresión de miR-138-5p en melanomas de mayor agresividad puede interpretarse como un mecanismo compensatorio para frenar el desarrollo y progresión del melanoma. En este sentido, cabe señalar que una de las limitaciones de nuestro estudio es que no se ha realizado microdissección de las muestras, por lo que la expresión de miR-138-5p podría no sólo corresponder a los melanocitos tumorales, sino también a otras células del microambiente tumoral como respuesta a la carcinogénesis.

De forma adicional, hemos detectado sobreexpresión de miR-138-5p en melanomas portadores de mutaciones en el promotor del gen *TERT* comparados con los *wt*. A este respecto, mencionar que se ha descrito la implicación del miR-138-5p en la regulación del gen *TERT* mediante su unión a la región 3'UTR, con mayor expresión de telomerasa a menores niveles de miR-138-5p (Mitomo *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2015). Numerosos estudios han demostrado que la expresión de telomerasa se detecta en más del 90% de las neoplasias malignas (Heidenreich *et al.*, 2014B). De hecho, estudios de expresión de telomerasa a nivel de proteína mediante inmunohistoquímica han demostrado niveles similares en melanomas portadores de mutaciones en el gen *TERT* y *wt* (Pópulo *et al.*, 2014; Kohli *et al.*, 2017, Masui *et*

Discusión

al., 2018; Hugdahl *et al.*, 2018). Todo ello apunta a que, además de las ya mencionadas mutaciones en el gen *TERT*, los mecanismos epigenéticos podrían también estar implicados en la regulación post-transcripcional de la expresión de telomerasa. Por ello, una de las hipótesis es que la sobreexpresión de miR-138-5p identificada en nuestra serie en los melanomas portadores de mutación, podría representar un mecanismo molecular compensatorio para regular la expresión de telomerasa en este subgrupo de melanomas.

En el presente estudio se ha identificado un incremento progresivo de expresión de miR-130b-3p desde lesiones melanocíticas benignas a melanomas metastásicos. Este resultado concuerda con lo descrito por Sand M *et al.*, que analizan la expresión diferencial de miRNAs en melanomas primarios, metastásicos y nevus, y observan una sobreexpresión de miR-130b-3p en melanomas primarios y metastásicos con respecto a nevus (Sand *et al.*, 2013). Adicionalmente, dentro de los melanomas primarios, hemos objetivado una sobreexpresión de miR-130b-3p en aquellos con alta tasa de crecimiento, mayor índice de Breslow y presencia de mitosis. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente, ya que miR-130b-3p se ha descrito como un oncogén en diversas neoplasias malignas. Colangelo *et al.* han demostrado que miR-130-3p promueve la transición epitelio-mesénquima y favorece el desarrollo de tumores de mayor tamaño y desdiferenciados (Colangelo *et al.*, 2013). Asimismo, Yu *et al.* y Egawa *et al.* han demostrado que aumenta la migración e invasión celular mediante su interacción con el gen *PTEN* (Yu *et al.*, 2015; Egawa *et al.*, 2016).

Otro de los miRNAs en los que hemos identificado expresión diferencial entre los grupos de estudio es el miR-34a-5p. De nuevo, los niveles de expresión se han incrementado de forma progresiva desde nevus melanocíticos, a melanomas primarios y metastásicos. Además, en los estudios de expresión por *arrays* y su validación por PCR en tiempo real en las 22 muestras iniciales, hemos observado sobreexpresión de miR-34a-5p en los melanomas con mayor espesor tumoral y con presencia de mitosis; aunque esta asociación no ha mantenido significación estadística en la segunda serie de muestras. Estos resultados contrastan con lo reportado en la literatura, ya que miR-34a-5p se ha descrito como un supresor tumoral en diversas neoplasias mediante su interacción con genes diana como *CDK4/6*, *cyclin E*, *MET*, *MYC* y *Bcl-2* (Yin *et al.*, 2013). En cuanto a su implicación en melanoma, Satzger *et al.* han descrito menor expresión en melanomas con respecto a nevus melanocíticos (Satzger *et al.*, 2010). A su vez, Yan *et al.* han demostrado menor expresión en células de melanoma uveal comparado con melanocitos normales, así como una disminución de la proliferación y migración celular gracias a su interacción con la región 3'UTR del gen *MET* (Yan *et al.*, 2009). De forma similar, Yamazaki *et al.* han estudiado cuatro líneas celulares de melanoma y han demostrado que su sobreexpresión suprime la invasión celular (Yamazaki *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados aquí obtenidos van en la línea de los reportados por Latchana *et al.*, que han estudiado la expresión de miR-34a-5p en una serie de neoplasias spitzoides y han identificado sobreexpresión en las neoplasias spitzoides atípicas comparadas con las benignas (Latchana *et al.*, 2016b). Al igual que la expresión de miR-138-5p, la sobreexpresión de miR-34a-5p podría representar un mecanismo

Discusión

compensatorio para suprimir el desarrollo y progresión del melanoma. De hecho, recientemente se ha reportado que la sobreexpresión de miR-34a-5p induce una disminución de la expresión de PD-L1 en muestras de LMA (Wang *et al.*, 2015). Por tanto, una posible hipótesis es que la sobreexpresión de miR-34a-5p podría ser un mecanismo compensatorio que incremente la respuesta inmune antitumoral en las neoplasias melanocíticas.

Por otro lado, a pesar de que se ha reportado la implicación de miR-34a-5p en la regulación de la expresión de telomerasa, en nuestra serie no hemos observado asociación significativa de este miRNA con las mutaciones en el promotor del gen *TERT*. Xu *et al.* han demostrado que la sobreexpresión de miR-34a-5p inhibe la actividad telomérica e induce acortamiento de los telómeros en células de hepatocarcinoma a través de su interacción con los genes *c-MYC* y *FOXMI* (Xu *et al.*, 2015).

Con respecto a miR-30b-5p, se ha identificado su infraexpresión en diversas neoplasias, y se ha reportado su papel como supresor tumoral mediante su interacción con genes diana como *EIF5A2*, *HOXA1* y *EGFR* (Tian *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2018). Por el contrario, en melanoma se ha descrito el papel de miR-30b-5p como promotor de la progresión tumoral, al haber identificado mayores niveles de expresión en melanomas metastásicos comparados con primarios, así como una sobreexpresión en melanomas con mayor índice de Breslow, subtipo histológico nodular y estadio tumoral avanzado (Gaziel-Sovran *et al.*, 2011). Estos datos concuerdan con lo descrito en nuestra serie, en la que los

estudios de expresión mediante *arrays* y PCR en tiempo real en las 22 muestras iniciales identificaron sobreexpresión en melanomas con alta tasa de crecimiento, mayor índice de Breslow, presencia de mitosis y mutaciones en el promotor del gen *TERT*. Sin embargo, estos resultados no se han confirmado en la segunda serie de melanomas. A este respecto, cabe mencionar que podría haber sido necesario un mayor número de muestras analizadas para mantener dicha significación estadística.

CONCLUSIONES

1. El estudio del **perfil genético** ha permitido obtener las siguientes conclusiones:
 - 1.1 El diseño del panel de genes de NGS incluye un total de 35 genes con una cobertura global del 97,76%. El diseño es específico de melanoma dado que incluye genes con utilidad en su diagnóstico, pronóstico y tratamiento.
 - 1.2 Las métricas de calidad de la metodología demuestran un alto número de lecturas por amplicón con elevada uniformidad. La metodología posee alta sensibilidad analítica.
 - 1.3 Los genes más frecuentemente mutados son *BRAF*, el promotor del gen *TERT* y *NRAS*. Son frecuentes las mutaciones concurrentes entre los diferentes genes incluidos en el diseño del panel.
 - 1.4 Las mutaciones varían en función de la localización de los melanomas, del subtipo histológico, y de los parámetros histopatológicos con valor pronóstico como el índice de Breslow, la ulceración, el índice mitótico y el fenómeno de regresión. Las mutaciones en el promotor del gen *TERT* se asocian a menor supervivencia libre de enfermedad.
 - 1.5 Los melanomas primarios se clasifican correctamente en los 4 subtipos moleculares propuestos por la TCGA.

Conclusiones

- 1.6 El estudio de los melanomas metastásicos revela elevada concordancia intertumoral en los genes *BRAF*, *NRAS* y promotor del gen *TERT*.
2. El estudio **de metilación** ha permitido obtener las siguientes conclusiones:
 - 2.1 Los genes supresores tumorales *RARB*, *PTEN*, *APC*, *CDH13* y *ESR1* se encuentran frecuentemente metilados en los melanomas de nuestra serie.
 - 2.2 La frecuencia de metilación difiere significativamente en función de las características clínico-patológicas. Los genes *RARB*, *PTEN* y *CDH13* se asocian a características de mayor agresividad, así como a una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.
3. El estudio de **expresión de miRNAs** ha permitido obtener las siguientes conclusiones:
 - 3.1 El estudio de los perfiles de expresión de miRNAs ha permitido identificar una firma de cuatro miRNAs diferencialmente expresados en los melanomas primarios en base a las características clínico-patológicas de mal pronóstico y al estado mutacional del promotor del gen *TERT*.

3.2 La sobreexpresión de los miRNAs seleccionados varía en función de las características clínico-patológicas. La mayor expresión de miR-138-5p se asocia a melanomas con características clínico-patológicas de mayor agresividad y melanomas portadores de mutaciones en el promotor del gen *TERT*.

3.3 Se observa un incremento progresivo de la expresión de miR-34a-5p, miR-130b-3p y miR-138-5p desde nevus melanocíticos a metástasis de melanoma.

4. El estudio de las alteraciones genéticas y epigenéticas del melanoma proporciona información complementaria a las características clínico-patológicas. Su empleo en la práctica clínica podría ser de utilidad en el diagnóstico, en la estratificación de los pacientes en base a su pronóstico, y en su tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5489-94.
2. Angulo M, Lecuona E, Sznajder JI. Role of MicroRNAs in lung disease. *Arch Bronconeumol.* 2012;48:325-30
3. Aoude LG, Wadt KA, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28:148-60.
4. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, et al. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept.* 2017;7:1-6.
5. Arthofer W, Steiner FM, Schlick-Steiner BC. Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis. *Mol Genet Genomics.* 2011;286:225-35.
6. Austin PF, Cruse CW, Lyman G, et al. Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. *Ann Surg Oncol.* 1994;1:487-94.
7. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2012;30:2678-83.
8. Babapoor S, Fleming E, Wu R, Dadras SS. A novel miR-451a isomiR, associated with amelanotypic phenotype, acts as a tumor suppressor in melanoma by retarding cell migration and invasion. *PLoS One.* 2014;9:e107502.
9. Babapoor S, Wu R, Kozubek J, et al. Identification of microRNAs associated with invasive and aggressive

Bibliografia

- phenotype in cutaneous melanoma by next-generation sequencing. *Lab Invest.* 2017; 97:636-648.
10. Baco M, Chu CY, Bouet S, et al. Analysis of melanoma-related microRNAs expression during the spontaneous regression of cutaneous melanomas in MeLiM pigs. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27:668-70.
 11. Bai M, Zhang H, Si L, et al. Upregulation of Serum miR-10b Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Melanoma. *J Cancer.* 2017;8:2487-2491.
 12. Bai X, Kong Y, Chi Z, 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.
 13. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001;19:3622-34.
 14. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
 15. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol.* 2010;28:2452-2459.
 16. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF. Update on the melanoma staging system: the importance of sentinel node staging and primary tumor mitotic rate. *J Surg Oncol* 2011;104:379-85.

17. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Age as a prognostic factor in patients with localized melanoma and regional metastases. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:3961-8.
18. Balch CM. Decreased Survival Rates of Older-Aged Patients with Melanoma: Biological Differences or Undertreatment? *Ann Surg Oncol.* 2015;22:2101-3.
19. Barata P, Sood AK, Hong DS. RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: Current status and future directions. *Cancer Treat Rev.* 2016 Nov;50:35-47.
20. Bastian BC. Hypothesis: A Role for Telomere Crisis in Spontaneous Regression of Melanoma. *Arch Dermatol* 2003;139:667-8.
21. Batista R, Cruvinel-Carloni A, Vinagre, et al. The prognostic impact of TERT promoter mutations in glioblastomas is modified by the rs2853669 single nucleotide polymorphism. *Int J Cancer.* 2016;139:414-23.
22. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science.* 2015;348:1036-9.
23. Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhães A, et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res.* 2016;14:315-23.
24. Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature.* 2012;485:502-6.
25. Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature.* 2011;480:94-8.

Bibliografía

26. Bonazzi VF, Stark MS, Hayward NK. MicroRNA regulation of melanoma progression. *Melanoma Res.* 2012;22:101-13.
27. Bosetti C, La VC, Naldi L, et al. Mortality from cutaneous malignant melanoma in Europe. Has the epidemic levelled off? *Melanoma Res* 2004;14:301-9.
28. Botella-Estrada R, Nagore E. Estado actual del ganglio centinela en el melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2011;102:749-53.
29. Botella-Estrada R, Traves V, Requena C, et al. Correlation of histologic regression in primary melanoma with sentinel node status. *JAMA Dermatol.* 2014;150:828-35.
30. Boursault L, Haddad V, Vergier B, et al. Tumor Homogeneity between Primary and Metastatic Sites for BRAF Status in Metastatic Melanoma Determined by Immunohistochemical and Molecular Testing. *PLoS One.* 2013; 8: e70826.
31. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-8.
32. Bradish JR, Richey JD, Post KM, et al. Discordancy in BRAF mutations among primary and metastatic melanoma lesions: clinical implications for targeted therapy. *Mod Pathol.* 2015;28:480–486.
33. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23:763-70.
34. Buchbinder EI, Sosman JA, Lawrence DP, et al. Phase 2 study of sunitinib in patients with metastatic mucosal or acral melanoma. *Cancer.* 2015;121:4007-15.

35. Cancer Genome Atlas Network. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, Arachchi H, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161:1681-96.
36. Carlson JA , Caldeira Xavier JC Jr, Tarasen A, et al. Next-Generation Sequencing Reveals Pathway Activations and New Routes to Targeted Therapies in Cutaneous Metastatic Melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2017;39:1-13.
37. Carvalho L, Lipay M, Belfort F, et al. Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59:961-8.
38. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011 Jun;364:2507-16.
39. Chen D, Wang YY, Chuai ZR, et al. High-resolution melting analysis for accurate detection of BRAF mutations: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2014;4:4168.
40. Chen K, Meric-Bernstam F, Zhao H, et al. Clinical actionability enhanced through deep targeted sequencing of solid tumors. *Clin Chem*. 2015;61:544-53.
41. Chen Y, Cao KE, Wang S, et al. MicroRNA-138 suppresses proliferation, invasion and glycolysis in malignant melanoma cells by targeting HIF-1 α . *Exp Ther Med*. 2016;11:2513-2518.
42. Ciotti P, Struewing JP, Mantelli M, et al. A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. *Am J Hum Genet*. 2000;67:311-9.

Bibliografía

43. Cirenajwis H, Lauss M, Ekedahl H, et al. NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics. *Mol Oncol*. 2017;11:438-451.
44. Clark WH Jr, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol*. 1986;17:443-50.
45. Colangelo T, Fucci A, Votino C, et al. MicroRNA-130b promotes tumor development and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2013;15:1086-99.
46. Colombino M, Capone M, Lissia A, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:2522-9.
47. Conway K, Edmiston SN, Khondker ZS, et al. DNA-methylation profiling distinguishes malignant melanomas from benign nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24:352-60.
48. Córdoba-Lanús E, Hernández-Jiménez JG, Medina-Coello C, et al. MC1R gene variants and sporadic malignant melanoma susceptibility in the Canary Islands population. *Arch Dermatol Res*. 2014;306:51-8.
49. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2135-47.
50. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:4340-6.
51. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462:739-44.

52. Dankort D, Curley DP, Carlidge RA, et al. BRAF (V600E) cooperates with PTEN loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* 2009;41:544-552.
53. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949-54.
54. Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, et al. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer.* 2008;99:1265-8.
55. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J.* 2012;18:142-7.
56. Dewar DJ, Newell B, Green MA, et al. The microanatomic location of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes predicts nonsentinel lymph node involvement. *J Clin Oncol.* 2004;22:3345-9.
57. De Araújo ÉS, Pramio DT, Kashiwabara AY, et al. DNA Methylation Levels of Melanoma Risk Genes Are Associated with Clinical Characteristics of Melanoma Patients. *Biomed Res Int.* 2015;2015:376423.
58. De Juan I, Esteban E, Palanca S, et al. High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115:405-14.
59. Dias-Santagata D, Su Y, Hoang MP. Immunohistochemical Detection of NRAS Q61R Mutation in Diverse Tumor Types. *Am J Clin Pathol.* 2016;145:29-34.
60. Díaz-Martínez M, Benito-Jardón L, Alonso L, et al. miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Res.* 2018;78:1017-1030.

Bibliografia

61. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 2002;146 Suppl 61:1–6.
62. D'mello SA, Flanagan JU, Green TN, et al. Evidence That GRIN2A Mutations in Melanoma Correlate with Decreased Survival. *Front Oncol.* 2014;3:333.
63. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, 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.
64. Dutton-Regester K, Irwin D, Hunt P, et al. A high-throughput panel for identifying clinically relevant mutation profiles in melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2012;11:888-97.
65. Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* 2006;16:471-8.
66. Egawa H, Jingushi K, Hirono T, et al. The miR-130 family promotes cell migration and invasion in bladder cancer through FAK and AKT phosphorylation by regulating PTEN. *Sci Rep.* 2016;6:20574.
67. Ekedahl H, Lauss M, Olsson H, et al. High TERT promoter mutation frequency in non-acral cutaneous metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29:598-600.
68. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:20411-6.

69. Erlandson A, Appelqvist F, Enerbäck C. Epigenetic mutations in CDKN2A in western Swedish families with hereditary malignant melanoma. *Mol Med Rep.* 2008;1:89-91.
70. Fadaki N, Li R, Parrett B, et al. Is head and neck melanoma different from trunk and extremity melanomas with respect to sentinel lymph node status and clinical outcome? *Ann Surg Oncol.* 2013;20:3089-97.
71. Fattore L, Mancini R, Acunzo M, et al. miR-579-3p controls melanoma progression and resistance to target therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E5005-13.
72. Fernández-Canedo I, Rivas-Ruiz F, Fúnez-Liébanac R, et al. Epidemiología del melanoma en una población multicultural mediterránea. *Piel* 2014;29:401-5.
73. Florell SR, Boucher KM, Garibotti G, et al. Population-based analysis of prognostic factors and survival in familial melanoma. *J Clin Oncol.* 2005;23:7168-77.
74. Froyen G, Broekmans A, Hillen F, et al. Validation and Application of a Custom-Designed Targeted Next-Generation Sequencing Panel for the Diagnostic Mutational Profiling of Solid Tumors. *PLoS One.* 2016;11:e0154038.
75. Fu S, Wu H, Zhang H, et al. DNA methylation/hydroxymethylation in melanoma. *Oncotarget.* 2017;8:78163-78173.
76. Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, et al. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci.* 2004;95:962-8.
77. Gao L, Smit MA, van den Oord JJ, et al. Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing

Bibliografia

- of MAPK13 in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26:542-54.
78. Gao J, Wu H, Wang L, et al. Validation of targeted next-generation sequencing for RAS mutation detection in FFPE colorectal cancer tissues: comparison with Sanger sequencing and ARMS-Scorpion real-time PCR. *BMJ Open.* 2016 Jan 8;6(1):e009532.
79. Gazieli-Sovran A, Segura MF, Di Micco R, et al. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell.* 2011;20:104-18.
80. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, et al. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol.* 1999;17:976-83.
81. Glud M, Gniadecki R. MicroRNAs in the pathogenesis of malignant melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27:142-50.
82. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, et al. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126:154-160.
83. Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al; Lund Melanoma Study Group; Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 2007;44:99-106.
84. Gonzalgo ML, Bender CM, You EH, et al. Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma:

- comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res.* 1997;57:5336-47.
85. Goswami RS, Patel KP, Singh RR, et al. Hotspot mutation panel testing reveals clonal evolution in a study of 265 paired primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res.* 2015;21:2644-51.
86. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol.* 2013;133(8):e11.
87. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al; for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert Panel and the International Melanoma Database and Discovery Platform. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:472-492.
88. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106 (9).
89. Griewank KG, Schadendorf D. Panel sequencing melanomas. *J Invest Dermatol.* 2015;135:335-336.
90. Grignol V, Fairchild ET, Zimmerer JM, et al. miR-21 and miR-155 are associated with mitotic activity and lesion depth of borderline melanocytic lesions. *Br J Cancer.* 2011;105:1023-9.
91. Guadagni S, Fiorentini G, Clementi M, et al. MGMT methylation correlates with melphalan pelvic perfusion survival in stage III melanoma patients: a pilot study.

Bibliografia

- Melanoma Res. 2017 May 10. doi: 10.1097/CMR.0000000000000367
92. Gualano MR, Osella-Abate S, Scaioli G, et al. Prognostic role of Histologic regression in primary cutaneous melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2018;178:357-362.
 93. Guitart J, Lowe L, Piepkorn M, et al. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases. *Arch Dermatol.* 2002;138:603-8.
 94. Halait H, Demartin K, Shah S, et al. Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the BRAF gene, used as the companion diagnostic test for the novel BRAF inhibitor vemurafenib in metastatic melanoma. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21:1-8.
 95. Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23:210-5.
 96. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;380:358-65.
 97. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature.* 2017 May 11;545:175-180.
 98. Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nat Commun.* 2014;5:3401.

99. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2014;24:30-7.
100. Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, et al. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer.* 2007;97:1457-64.
101. Heinzerling L, Baiter M, Kühnapfel S, et al. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. *Br J Cancer.* 2013;109:2833–2841.
102. Ihle MA, Fassunke J, König K, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer.* 2014;14:13.
103. Hintzsche JD, Gorden NT, Amato CM, et al. Whole-exome sequencing identifies recurrent SF3B1 R625 mutation and comutation of NF1 and KIT in mucosal melanoma. *Melanoma Res.* 2017;27:189-199.
104. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med.* 1995;1:249-55.
105. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, et al. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer.* 1997;33:1932-6.
106. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150:251-63.

Bibliografia

107. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol.* 2013;31:3182-90.
108. Holst LM, Kaczkowski B, Glud M, et al. The microRNA molecular signature of atypic and common acquired melanocytic nevi: differential expression of miR-125b and let-7c. *Exp Dermatol.* 2011;20:278-80.
109. Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, et al. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene.* 2004;23:4014-22
110. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.* 2013;339:959-61.
111. Huang SD, Yuan Y, Zhuang CW, et al. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2012;11:51.
112. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, et al. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science.* 2013;339:957–9.
113. Hugdahl E, Kalvenes MB, Mannelqvist M, et al. Prognostic impact and concordance of TERT promoter mutation and protein expression in matched primary and metastatic cutaneous melanoma. *Br J Cancer.* 2018;118:98-105.

114. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 1994;8:15-21.
115. Huynh KT, Takei Y, Kuo C, et al. Aberrant hypermethylation in primary tumours and sentinel lymph node metastases in paediatric patients with cutaneous melanoma. *Br J Dermatol.* 2012;166:1319-26.
116. In 't Hout FE, Haydu LE, Murali R, et al. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 2012;255:1165-70.
117. Iorio MV, Piovan C, Croce CM. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799:694-701.
118. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, et al. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 2001;61:3573-7.
119. Jeck WR, Parker J, Carson CC, et al. Targeted next generation sequencing identifies clinically actionable mutations in patients with melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27:653-63.
120. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19:341-365.
121. Jiang L, Lv X, Li J, et al. The status of microRNA-21 expression and its clinical significance in human cutaneous malignant melanoma. *Acta Histochem.* 2012;114:582-8.

Bibliografia

122. Jin Z, Guan L, Song Y, et al. MicroRNA-138 regulates chemoresistance in human non-small cell lung cancer via epithelial mesenchymal transition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20:1080-6.
123. Jin SG, Xiong W, Wu X, et al. The DNA methylation landscape of human melanoma. *Genomics.* 2015;106:322-30.
124. Jönsson M, Ekstrand A, Edekling T, et al. Experiences from treatment-predictive KRAS testing; high mutation frequency in rectal cancers from females and concurrent mutations in the same tumor. *BMC Clin Pathol.* 2009 Oct 15;9:8.
125. Kohli JS, Mir H, Wasif A, et al. ETS1, nucleolar and non-nucleolar TERT expression in nevus to melanoma progression. *Oncotarget* 2017;8:104408-17.
126. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2012;44:1006-14.
127. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet.* 2015;47:996-1002.
128. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371:1867-76.
129. Lahtz C, Stranzenbach R, Fiedler E, et al. Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130:620-2.
130. Larsen AC. Conjunctival malignant melanoma in Denmark: epidemiology, treatment and prognosis with special emphasis

- on tumorigenesis and genetic profile. *Acta Ophthalmol.* 2016 May;94 Thesis 1:1-27.
131. Latchana N, Ganju A, Howard JH, Carson WE 3rd. MicroRNA dysregulation in melanoma. *Surg Oncol.* 2016;25:184-9.
132. Latchana N, Regan K, Howard JH, et al. Global microRNA profiling for diagnostic appraisal of melanocytic Spitz tumors. *J Surg Res.* 2016;205:350-358.
133. Lauss M, Ringnér M, Karlsson A, et al. DNA methylation subgroups in melanoma are associated with proliferative and immunological processes. *BMC Med Genomics.* 2015;8:73.
134. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499:214-218.
135. Lázaro Ochaita P, Bittini Copano A, Bueno Marco C, et al. Mapeo linfático y biopsia del ganglio centinela en el melanoma cutáneo. *Actas Dermosifiliogr* 2001;92:1-8.
136. Lee JJ, Murphy GF, Lian CG. Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines. *Lab Invest.* 2014;94:822-38.
137. Lee JJ, Sholl LM, Lindeman NI, et al. Targeted next-generation sequencing reveals high frequency of mutations in epigenetic regulators across treatment-naïve patient melanomas. *Clin Epigenetics.* 2015 Jun 9;7:59.
138. Lee S, Opresko P, Pappo A, et al. Association of TERT promoter mutations with telomerase expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29:391-3

Bibliografía

139. Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Garbe C. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. *J Clin Oncol.* 2004;22:3660-7.
140. Leiter U, Meier F, Schittek B, Garbe C. The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol.* 2004;86:172-8.
141. Ley 1/2003 de 28 de enero, de Derechos e Información al paciente de la Comunidad Valenciana. <http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/25/pdfs/A07587-07595.pdf>.
142. Ley 14/2007 de 3 de julio, de Investigación Biomédica. http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fdinvestigacion/Ley_Investigacion_Biomedica.pdf.
143. Li N. Low Expression of Mir-137 Predicts Poor Prognosis in Cutaneous Melanoma Patients. *Med Sci Monit.* 2016 Jan 14;22:140-4.
144. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19:4-23.
145. Li Q, Zhang X, Li N, et al. miR-30b inhibits cancer cell growth, migration, and invasion by targeting homeobox A1 in esophageal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485:506-512.
146. Li Y, Bare LA, Bender RA, et al. Cost Effectiveness of Sequencing 34 Cancer-Associated Genes as an Aid for

- Treatment Selection in Patients with Metastatic Melanoma. *Mol Diagn Ther.* 2015;19:169-77.
147. Liao JY, Tsai JH, Jeng YM, et al. TERT promoter mutation is uncommon in acral lentiginous melanoma. *J Cutan Pathol.* 2014;41:504-8.
148. Lim SY, Menzies AM, Rizos H. Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Cancer.* 2017;123:2118-2129.
149. Lin N, Zhou Y, Lian X, Tu Y. Expression of microRNA-106b and its clinical significance in cutaneous melanoma. *Genet Mol Res.* 2015;14:16379-85.
150. Lin YL, Sun G, Liu XQ, et al. Clinical significance of CDH13 promoter methylation in serum samples from patients with bladder transitional cell carcinoma. *J Int Med Res.* 2011;39:179-86.
151. Liu W, Dowling JP, Murray WK, et al. Rate of growth in melanomas: characteristics and associations of rapidly growing melanomas. *Arch Dermatol.* 2006;142:1551--1558.
152. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25:1402–1408.
153. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2015;386:444-51.
154. Lopez GY, Reitman ZJ, Solomon D, et al. IDH1(R132) mutation identified in one human melanoma metastasis, but

Bibliografía

- not correlated with metastases to the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398:585-7.
155. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One.* 2012;7:e35309.
156. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica.* 2014;99:465-73.
157. Manzano JL, Layos L, Bugés C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med.* 2016;4:237.
158. Mar VJ, Wong SQ, Logan A, et al. Clinical and pathological associations of the activating RAC1 P29S mutation in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;:1117-25.
159. Marzese DM, Scolyer RA, Huynh JL, et al. Epigenome-wide DNA methylation landscape of melanoma progression to brain metastasis reveals aberrations on homeobox D cluster associated with prognosis. *Hum Mol Genet.* 2014;23:226-38.
160. Marzese DM, Scolyer RA, Roqué M, et al. DNA methylation and gene deletion analysis of brain metastases in melanoma patients identifies mutually exclusive molecular alterations. *Neuro Oncol.* 2014;16:1499-509.
161. Martí RM, Sorolla A, Yeramian A. Nuevas dianas terapéuticas en el melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103:579-90.

162. Martin del Campo SE, Latchana N, Levine KM, et al. MiR-21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 expression: in vivo effects of MiR-21 inhibitor. *PLoS One*. 2015;10:e0115919.
163. Martorell-Calatayud A, Nagore E, Botella-Estrada R et al. Defining fast-growing melanomas: reappraisal of epidemiological, clinical and histological features. *Melanoma Res*. 2011;21:131-8.
164. Masbäck A, Olsson H, Westerdahl J, et al. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Res*. 2001;11:435-45.
165. Masui K, Komori T, Kato Y, et al. Elevated TERT Expression in TERT-Wildtype Adult Diffuse Gliomas: Histological Evaluation with a Novel TERT-Specific Antibody. *Biomed Res Int*. 2018;2018:7945845.
166. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:560-4.
167. McGovern VJ. Spontaneous regression of melanoma. *Pathology*. 1975;7:91-9.
168. Meng F, Zhang Y, Li X, et al. Clinical significance of miR-138 in patients with malignant melanoma through targeting of PDK1 in the PI3K/AKT autophagy signaling pathway. *Oncol Rep*. 2017;38:1655-1662.
169. Menzies AM, Lum T, Wilmott JS, et al. Inpatient homogeneity of BRAFV600E expression in melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2014;38:377-82.

Bibliografia

170. Mervic L, Leiter U, Meier F, et al. Sex differences in survival of cutaneous melanoma are age dependent: an analysis of 7338 patients. *Melanoma Res.* 2011;21:244-52.
171. Micevic G, Theodosakis N, Bosenberg M. Aberrant DNA methylation in melanoma: biomarker and therapeutic opportunities. *Clin Epigenetics.* 2017;9:34.
172. Miller JJ, Shih HA, Andronesi OC, Cahill DP. Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: Evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer.* 2017;123:4535-4546.
173. Mione M, Bosserhoff A. MicroRNAs in melanocyte and melanoma biology. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28:340-54.
174. Miraflor AP, de Abreu FB, Peterson JD, et al. Somatic mutation analysis in melanoma using targeted next generation sequencing. *Exp Mol Pathol.* 2017;103:172-177.
175. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci.* 2008;99:280-6.
176. Mori T, O'Day SJ, Umetani N, et al. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2005;23:9351-8.
177. Mori T, Martinez SR, O'Day SJ, et al. Estrogen receptor-alpha methylation predicts melanoma progression. *Cancer Res.* 2006;66:6692-8.
178. Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992;127:392-9.

179. Murria R, Palanca S, de Juan I, et al. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2014 15;5:375-85.
180. Nagore E, Hacker E, Martorell-Calatayud A, et al. Prevalence of BRAF and NRAS mutations in fast-growing melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26:429-31.
181. Nagore E, Heidenreich B, Requena C, et al. TERT promoter mutations associate with fast-growing melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29:236-8.
182. Nagore E, Heidenreich B, Rachakonda S, et al. TERT promoter mutations in melanoma survival. *Int J Cancer.* 2016;139:75-84.
183. Najem A, Krayem M, Perdrix A, et al. New Drug Combination Strategies in Melanoma: Current Status and Future Directions. *Anticancer Res.* 2017;37:5941-5953.
184. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Melanoma [Internet]. Version 2.2019. p. 1–198. Available from: www.NCCN.com.
185. Nestle FO, Kerl H. Melanoma. En: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatología. 1ª edición en español.* Elsevier España. 2004 .Volumen 2. p 1989-1815.
186. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al; Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010;17:510-22.
187. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG

Bibliografia

- methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:e128.
188. Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2011;44:133-9.
189. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res.* 2014;74:2340-50.
190. Oláh J, Gyulai R, Korom I, et al. Tumour regression predicts higher risk of sentinel node involvement in thin cutaneous melanomas. *Br J Dermatol.* 2003;149: 662-3.
191. Omholt K, Kröckel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2006;16:197-200.
192. Ofner R, Ritter C, Heidenreich B, et al. Distribution of TERT promoter mutations in primary and metastatic melanomas in Austrian patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143:613-617.
193. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807-12.
194. Pathak S, Multani AS, McConkey DJ, et al. Spontaneous regression of cutaneous melanoma in sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomere erosion. *Int J Oncol.* 2000;17:1219-24.
195. Pellegrini C, Di Nardo L, Cipolloni G, et al. Heterogeneity of BRAF, NRAS, and TERT Promoter Mutational Status in Multiple Melanomas and Association with MC1R Genotype:

- Findings from Molecular and Immunohistochemical Analysis. *J Mol Diagn.* 2018;20:110-122.
196. Phan A, Touzet S, Dalle S, et al. Acral lentiginous melanoma: a clinicoprognostic study of 126 cases. *Br J Dermatol.* 2006;155:561-9.
197. Pinto R, De Summa S, Strippoli S, et al. The next generation of metastatic melanoma: uncovering the genetic variants for anti-BRAF therapy response. *Oncotarget.* 2016;7:25135-49.
198. Poliseno L, Haimovic A, Segura MF, et al. Histology-specific microRNA alterations in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2012;132:1860-8.
199. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20.
200. Pópulo H, Boaventura P, Vinagre J, et al. TERT promoter mutations in skin cancer: the effects of sun exposure and X-irradiation. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2251-2257.
201. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann Transl Med.* 2015;3:210.
202. Prickett TD, Wei X, Cardenas-Navia I, et al. Exon capture analysis of G protein-coupled receptors identifies activating mutations in GRM3 in melanoma. *Nat Genet.* 2011;43:1119-26.
203. Puig-Butillé JA, Carrera C, Kumar R, et al. Distribution of MC1R variants among melanoma subtypes: p.R163Q is associated with lentigo maligna melanoma in a Mediterranean population. *Br J Dermatol.* 2013;169:804-11.

Bibliografía

204. Qi Z, Zhang B, Zhang J, et al. MicroRNA-30b inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting the epidermal growth factor receptor. *Neoplasma*. 2018;65:192-200.
205. Qin X, Chen J, Wu L, Liu Z. MiR-30b-5p acts as a tumor suppressor, repressing cell proliferation and cell cycle in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:742-750.
206. Qin YZ, Xie XC, Liu HZ, et al. Screening and preliminary validation of miRNAs with the regulation of hTERT in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2015;33:2728-36.
207. Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, et al. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:17426-31.
208. Raimondi S, Sera F, Gandini S, et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008 Jun;122:2753-60.
209. Reddy BY, Miller DM, Tsao H. Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer*. 2017;123:2104-2117.
210. Reiman A, Kikuchi H, Scocchia D, et al. Validation of an NGS mutation detection panel for melanoma. *BMC Cancer*. 2017;17:150.
211. Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, et al. Regresión en el melanoma: problemas en su definición e implicación pronóstica. *Actas Dermosifiliog*. 2009;100:75.

212. Ribero S, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, et al. Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in AJCC stage I-II patients. *Br J Dermatol.* 2013;169:1240-1245.
213. Ribero S, Galli F, Osella-Abate S, et al; Italian Melanoma Intergroup. Prognostic impact of regression in patients with primary cutaneous melanoma >1 mm in thickness. *J Am Acad Dermatol.* 2019;80:99-105.e5.
214. Richtig G, Hoeller C, Kashofer K, et al. Beyond the BRAFV600E hotspot: biology and clinical implications of rare BRAF gene mutations in melanoma patients. *Br J Dermatol.* 2017;177:936-944.
215. Riveiro-Falkenbach E, Villanueva CA, Garrido MC, et al. Intra- and Inter-Tumoral Homogeneity of BRAF(V600E) Mutations in Melanoma Tumors. *J Invest Dermatol.* 2015;135:3078-3085.
216. Riveiro-Falkenbach E, Santos-Briz A, Ríos-Martín JJ, Rodríguez-Peralto JL. Controversies in Inpatient Melanoma BRAFV600E Mutation Status. *Am J Dermatopathol.* 2017;39:291-295.
217. Roach BA, Burton AL, Mays MP, et al. Does mitotic rate predict sentinel lymph node metastasis or survival in patients with intermediate and thick melanoma? *Am J Surg.* 2010;200:759-63.
218. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med.* 2015;372:30-9.

Bibliografía

219. Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet.* 2014;46:478-481.
220. Roh MR, Gupta S, Park KH, et al. Promoter Methylation of PTEN Is a Significant Prognostic Factor in Melanoma Survival. *J Invest Dermatol.* 2016;136:1002-11.
221. Rudolph P, Schubert C, Tamm S, et al. Telomerase activity in melanocytic lesions: A potential marker of tumor biology. *Am J Pathol.* 2000;156:1425-32.
222. Sáenz S, Conejo-Mir J, Cayuela A. Epidemiología del melanoma en España. *Actas Dermosifiliogr.* 2005;96:411-8.
223. Sand M, Skrygan M, Sand D, et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi. *Cell Tissue Res.* 2013;351:85-98.
224. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:5463-7.
225. Saint-Jean M, Quéreux G, Nguyen JM, et al. Is a single BRAF wild-type test sufficient to exclude melanoma patients from vemurafenib therapy? *J Invest Dermatol.* 2014;134:1468–1470.
226. Satzger I, Mattern A, Kuettler U, et al. MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. *Int J Cancer.* 2010;126:2553-62.

227. Satzger I, Mattern A, Kuettler U, et al. microRNA-21 is upregulated in malignant melanoma and influences apoptosis of melanocytic cells. *Exp Dermatol.* 2012;21:509-14.
228. Schinke C, Mo Y, Yu Y, et al. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2010;20:253-65.
229. Schwaederle M, Krishnamurthy N, Daniels GA, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter alterations across cancer types as detected by next-generation sequencing: A clinical and molecular analysis of 423 patients. *Cancer.* 2018;124:1288-1296.
230. Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, et al; Sunbelt Melanoma Trial. Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Ann Surg.* 2006;243:693-8.
231. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med.* 2015;373:1926-36.
232. Sha HH, Wang DD, Chen D, et al. MiR-138: A promising therapeutic target for cancer. *Tumour Biol.* 2017;39:1010428317697575.
233. Shi J, Yang XR, Ballew B, et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet.* 2014;46:482-6.
234. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, et al. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol.* 2011;178:1395-402.
235. Shull AY, Latham-Schwark A, Ramasamy P, et al. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One.* 2012;7:e43369.

Bibliografia

236. Sigalotti L, Covre A, Fratta E, et al. Whole genome methylation profiles as independent markers of survival in stage IIIC melanoma patients. *J Transl Med.* 2012;10:185.
237. Simon M, Hosen I, Gousias K, et al. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2015;17:45-52.
238. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, et al. Clinical validation of a next-generation sequencing screen for mutational hotspots in 46 cancer-related genes. *J Mol Diagn.* 2013;15:607-22.
239. Siroy AE, Boland GM, Milton DR, et al. Beyond BRAFV600: Clinical Mutation Panel Testing by Next-Generation Sequencing in Advanced Melanoma. *J Invest Dermatol.* 2015;135:508-515.
240. Spathis A, Katoulis AC, Damaskou V, et al. BRAF Mutation Status in Primary, Recurrent, and Metastatic Malignant Melanoma and Its Relation to Histopathological Parameters. *Dermatol Pract Concept.* 2019;9:54-62.
241. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004;64:7002-10.
242. Stark MS, Bonazzi VF, Boyle GM, et al. miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFⁱ sensitivity in melanoma. *Oncotarget.* 2015;6:17753-63.
243. Stebbins WG, Garibyan L, Sober AJ. Sentinel lymph node biopsy and melanoma: 2010 update Part I. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:723-34.
244. Stepulak A, Rola R, Polberg K, Ikonomidou C. Glutamate and its receptors in cancer. *J Neural Transm.* 2014;121:933-44.

245. Stiller M, Sucker A, Griewank K, et al. Single-strand DNA library preparation improves sequencing of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) cancer DNA. *Oncotarget*. 2016 3;7:59115-59128.
246. Stockman DL, Curry JL, Torres-Cabala CA, et al. Use of clinical next-generation sequencing to identify melanomas harboring SMARCB1 mutations. *J Cutan Pathol*. 2015;42:308-17.
247. Swick JM, Maize JC Sr. Molecular biology of melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67:1049-54.
248. Takata M, Lin J, Takayanagi S, et al. Genetic and epigenetic alterations in the differential diagnosis of malignant melanoma and spitzoid lesion. *Br J Dermatol*. 2007;156:1287-94.
249. Tanemura A, Terando AM, Sim MS, et al. CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1801-7.
250. Tejera-Vaquerizo A, Barrera-Vigo MV, López-Navarro N, Herrera-Ceballos E. Growth rate as a prognostic factor in localized invasive cutaneous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24:147-54.
251. Tejera-Vaquerizo A, Nagore E, Herrera-Acosta E, et al. Prediction of sentinel lymph node positivity by growth rate of cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*. 2012;148:577-84.
252. Tejera-Vaquerizo A, Martín-Cuevas P, Gallego E, et al. Predictors of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a classification and regression tree analysis. *Actas Dermosifiliogr*. 2015;106:208-18.

Bibliografía

253. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107:318-28.
254. Tejera-Vaquerizo A, Pérez-Cabello G, Marínez-Leborans L, et al. Is mitotic rate still useful in the management of patients with thin melanoma? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:2025-2029.
255. Tellez CS, Shen L, Estécio MR, et al. CpG island methylation profiling in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2009;19:146-55.
256. Tian R, Liu T, Qiao L, et al. Decreased serum microRNA-206 level predicts unfavorable prognosis in patients with melanoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:3097-103.
257. Tian SB, Yu JC, Liu YQ, et al. MiR-30b suppresses tumor migration and invasion by targeting EIF5A2 in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21:9337-47.
258. Thomas NE, Slater NA, Edmiston SN, et al. DNA methylation profiles in primary cutaneous melanomas are associated with clinically significant pathologic features. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27:1097-105.
259. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol.* 2011;29:2199-205.
260. Tsongalis GJ, Peterson JD, de Abreu FB, et al. Routine use of the Ion Torrent AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel for

- identification of clinically actionable somatic mutations. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:707-14.
261. Tuominen R, Jewell R, van den Oord JJ, et al. MGMT promoter methylation is associated with temozolomide response and prolonged progression-free survival in disseminated cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 2015;136:2844–53.
262. Turajlic S, Furney SJ, Stamp G, et al. Whole-genome sequencing reveals complex mechanisms of intrinsic resistance to BRAF inhibition. *Ann Oncol.* 2014;25:959-67.
263. Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, et al. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res.* 2000;60:1800-4.
264. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012;26:1131-55.
265. Uguen A, Guéguen P, Legoupil D, et al. Dual NRASQ61R and BRAFV600E mutation-specific immunohistochemistry completes molecular screening in melanoma samples in a routine practice. *Hum Pathol.* 2015;46:1582-91.
266. Uguen A, Talagas M, Marcorelles P, De Braekeleer M. BRAFV600E and NRASQ61R Homogeneity in Melanoma Tumors. *J Invest Dermatol.* 2016;136:337-8.
267. Vallarelli AF, Rachakonda PS, André J, et al. TERT promoter mutations in melanoma render TERT expression dependent on MAPK pathway activation. *Oncotarget.* 2016;7:53127-53136.
268. Van Akkooi AC, Nowecki ZI, Voit C, et al. Sentinel node tumor burden according to the Rotterdam criteria is the most

Bibliografia

- important prognostic factor for survival in melanoma patients: a multicenter study in 388 patients with positive sentinel nodes. *Ann Surg.* 2008;248:949-55.
269. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, et al; Dermatologic Cooperative Oncology Group of Germany (DeCOG). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014;4:94-109.
270. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:2191-9.
271. Varada S, Mahalingam M. Mutation stability in primary and metastatic melanoma: what we know and what we don't. *Histol Histopathol.* 2015;30:763-70.
272. Völler D, Ott C, Bosserhoff A. MicroRNAs in malignant melanoma. *Clin Biochem.* 2013;46:909-17.
273. Vu HL, Rosenbaum S, Purwin TJ, et al. RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28:590-8.
274. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004;116:855-67.
275. Wandler A, Riber-Hansen R, Hager H, et al. Quantification of microRNA-21 and microRNA-125b in melanoma tissue. *Melanoma Res.* 2017;27:417-428.
276. Wang K, Zhang ZW. Expression of miR-203 is decreased and associated with the prognosis of melanoma patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:13249-54.

277. Wang X, Li J, Dong K, et al. Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Signal*. 2015;27:443-52.
278. Ward KA, Lazovich D, Hordinsky MK. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67:1055-67.
279. Wat H, Senthilselvan A, Salopek TG. A retrospective, multicenter analysis of the predictive value of mitotic rate for sentinel lymph node (SLN) positivity in thin melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74:94-101.
280. Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, et al. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res*. 2014;74:4845-4852.
281. Wei J, Nduom EK, Kong LY, et al. MiR-138 exerts anti-glioma efficacy by targeting immune checkpoints. *Neuro Oncol*. 2016;18:639-48.
282. Wei X, Walia V, Lin JC, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet*. 2011;43:442-6.
283. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*. 2011;43:1018-21.
284. Wiesner T, Kiuru M, Scott SN, et al. NF1 Mutations Are Common in Desmoplastic Melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2015;39:1357-62.

Bibliografia

285. Woodman SE, Lazar AJ, Aldape KD, Davies MA. New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease. *Clin Cancer Res.* 2012;18:1195-200.
286. Worm J, Christensen C, Grønbaek K, et al. Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene.* 2004;23:5215-26.
287. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for medical Research Involving Human Subjects [<http://www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf>].
288. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 2003;22:3113-22.
289. Xia J, Jia P, Hutchinson KE, et al. A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: a road map for the study of genes with potential clinical relevance. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:1918-28.
290. Xu X, Chen W, Miao R, et al. miR-34a induces cellular senescence via modulation of telomerase activity in human hepatocellular carcinoma by targeting FoxM1/c-Myc pathway. *Oncotarget.* 2015;6:3988-4004.
291. Yaman B, Kandiloğlu G, Akalin T. BRAF-V600 mutation heterogeneity in primary and metastatic melanoma: a study with pyrosequencing and immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol.* 2016; 38:113–120.
292. Yamazaki H, Chijiwa T, Inoue Y, et al. Overexpression of the miR-34 family suppresses invasive growth of malignant melanoma with the wild-type p53 gene. *Exp Ther Med.* 2012;3:793-796.

293. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360:765-73.
294. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One.* 2012;7(1):e29336.
295. Yan D, Zhou X, Chen X, et al. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:1559-65.
296. Yang CH, Yue J, Pfeiffer SR, et al. MicroRNA miR-21 regulates the metastatic behavior of B16 melanoma cells. *J Biol Chem.* 2011;286:39172-8.
297. Yang R, Liu M, Liang H, et al. miR-138-5p contributes to cell proliferation and invasion by targeting Survivin in bladder cancer cells. *Mol Cancer.* 2016;15:82.
298. Ye Z, Fang B, Pan J, et al. miR-138 suppresses the proliferation, metastasis and autophagy of non-small cell lung cancer by targeting Sirt1. *Oncol Rep.* 2017;37:3244-3252.
299. Yeh YM, Chuang CM, Chao KC, Wang LH. MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1 α . *Int J Cancer.* 2013;133:867-78.
300. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, et al. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2013;32:1155-63.
301. Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature.* 2011;480:99-103.

Bibliografia

302. Yu T, Cao R, Li S, et al. MiR-130b plays an oncogenic role by repressing PTEN expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2015;15:29.
303. Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19:17-30.
304. Zhang J, Lu L, Xiong Y, et al. MLK3 promotes melanoma proliferation and invasion and is a target of microRNA-125b. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39:376-84.
305. Zhang J, Liu D, Feng Z, et al. MicroRNA-138 modulates metastasis and EMT in breast cancer cells by targeting vimentin. *Biomed Pharmacother*. 2016;77:135-41.
306. Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, Hayward NK. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29:266-83.
307. Zhao L, Yu H, Yi S, et al. The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7: 45370–45384.
308. Zhou Z, Li Z, Shen Y, Chen T. MicroRNA-138 directly targets TNFAIP8 and acts as a tumor suppressor in osteosarcoma. *Exp Ther Med*. 2017;14:3665-3673.

DOCUMENTOS ANEXOS

Anexo 1: Sondas empleadas para el estudio de metilación de promotores de TGSs (*SALSA MS-MLPA probemix ME001-C1 Tumour suppressor-1, MRC-Holland*).

Gen	Tamaño sonda	Pos Crom	Secuencia unión
<i>TIMP3</i>	142	22q12	TCCAGCGCCGAGGCGAGCTCGCTGCGGCCCATCCCCTCCCCTGGGCGGACTCGG
<i>APC</i>	148	5q22	CAGTGTGTAAATCCGCTGGATGCGGACCAAGGGCGCTCCCATCCCCTCGGAGCCCCG
<i>CDKN2A</i>	161	9p21	CAGAGGGGAAGAGGAAAGAGGAAGAAAGCGCTCAGATGCTCCCGCGGTGTCGTGAAGGTTAAACCGAAAAATAAAT
<i>MLH1</i>	167	3p22	CGTTGAGCATCTAGACGTTTCTTGGCTCTTCTGGCGCCAAAATGTCTGTCGTGGCAGGGGTTATCT
<i>MLH1</i>	463	3p22	CTGCTGAGGTGATCTGGCGCAGAGCGGAGGAGTGTCTGGCGCTTCTCAGGCTCTCTCTCT
<i>ATM</i>	184	11q22	GGAGGGAGGAGGCGAGAGGAGTCCGGATCTGCGCTGCAGCCACCGCCGGGTTGATACTACTTT
<i>RARB</i>	193	3p24	CCGCGGCTTGTGCGCTCGCTGCTCTCTGGCTGTCTGCTTTTGACAGGCTGCT
<i>CDKN2B</i>	211	9p21	CTGCGACAGCTCTGGAAGCCGGCGCGATCCCAACGGAGTCAACCGTTTCGGGAGG
<i>HIC1</i>	220	17p13	CCGCTCCAGATAAGAGTGTGCGGAAAGCGCGGCGGGGGTGTAGACGCGACCAAGGAC
<i>CHFR</i>	238	12q24.33	CGCGAGAGTAGGCGCTGGAGGGCGCTCGGCCATCTTTGATCTGACAGGCGACTTCGT
<i>BRCA1</i>	246	17q21	TTCTCAGATAAAGTGGCCCTGCGCTCAGGAGGCTTACCCTTCTGCTGGGTAAGG
<i>CASP8</i>	265	2q33	CTTTCAATAAAGCATGTCCAGCGCTCGGGCTTAGTTGACAGTCCATGAATGTCTGCCACA
<i>CDKN1B</i>	274	12p13	AGCCCTGCGCGCTCCTAGAGCTCGGGCCGTGGCTGTGGGGTCTGTGTCTTT
<i>LLLN</i>	292	10q23	CACCGGAGCGGCGCAGGAGAGGCTGCGGGGTGGTCCCACTCACAGGGAT
<i>BRCA2</i>	301	13q13	CGGGAGAAGCGTAGGGGACAGATTTGTACCGCGCGGTTTTTGTAGCTTACTCCGGCCAAAAAAGA
<i>CD44</i>	319	11p13	CTCTTTCCCGCCGCTCCTCCGTTCTGCTCCGGACACCATGGACAAGTTTTGGTGG
<i>RASSF1</i>	328	3p21	CAGTCCCTGCACCAAGTTTCCATTGCGCGGGCTCTCCTCAGCTCCTCCCGCCGC
<i>RASSF1</i>	382	3p21	GTCCACAGGGCGGCCCCGACTTCAGCGCTCCTCCCAAGATCCAGA
<i>DAPK1</i>	346	9q21	CGCGAGGATCTGGAGCGAACTGCTGCGCTCTGGTGGGCGCTCCCTCCCTCCCT
<i>VHL</i>	353	3p25	CGGAAGACTACGAGGTGACTCGGGAGCGCGCACGACGCTCCGCCCCGCTCCGACC
<i>ESR1</i>	373	6q25	CGCCCCGTGTACAACCTACCCCGAGGGCGCGCTACGAGTTCAACGCGCCGGC
<i>TP73</i>	400	1p36	CGCCCGAAGGGGACGACGAAACCGGGGCCCCGCGCAGGCCAGCCGGGA
<i>FHIT</i>	409	3p14	CGCGGGTCTGGGTTCCACGCGCGTCAAGTTCATACCCCGGAGCCAGTGGG
<i>CADMI</i>	427	11q23	CTGGAGCCGAGTCTTGCACGCCAGCGCGCCGGGAGAACACTTTTTCTTGTATCCGGGGAAAGC
<i>CDH13</i>	436	16q23	TTCTGTGCGTTCTCTGTCCAGGTAGGGAAGAGGGGTGCCGGGCGCGCTGTG
<i>GSTP1</i>	454	11q13	CGAAGAGCGCCCGCGCGCTGACTCAGCACTGGGGCGGAGCGGGGGGGACC
<i>CREM</i>	136	10p11.21	GGTCTCCACCAGGTGCTACAATTGTACAGTACGACAGACAATCAGCTGATGGCACACAGCAGT
<i>PARK2</i>	154	6q26	CGTTCACGACCCCTCAACTTGGCTACTCCCTGCCTTGTGTGGTAAGTCTAGCATGTTTTCTCTCCAT
<i>TNFRSF1A</i>	175	12p13	GCCACACTGCCCTGAGCCCAATGGGGAGTGAAGAGGCAATAGTGTCTGGC
<i>MLH3</i>	202	14q24	GCGACCTGTTCTTCTTCTTCTCCGAGAGCTCGAGCAGAGAGGACTGTGATGAGACAGGATAACAG
<i>PAH</i>	229	12q23	CAGTGCCTGTGTTCCCAAGAACCATTCAAGAGCTGGACAGATTTGCAATCAGATTCTCAG
<i>BCL2</i>	256	18q21	CTTCTCTGGCTGTCTGGAAGACTCTGCTCAGTTTTGCCCCGTGTGGGAGCTTG
<i>TSC2</i>	281	16p13	GAGCCAGAGAGAGGCTCTGAGAAGAAGACCAGCGCCCTTTCTCTCCACAGGGCCTCT
<i>CDK6</i>	310	7q21	GCGTGATTGGACTCCCAGGAGAAGAAGACTGGCTAGAGATGTTGCCCTTCCAGGCAGGCTTTTCA
<i>CDH1</i>	337	16q22	TATGAAGAAAGCGGTTCCGAAAGTCTGATGCTGAGCTCCCTGAACCTCAGAGTCAGACAAAGACAGGAC
<i>CELF-2</i>	364	10p14	CAATTGCCATTTTTCTCTGACATCTCACTGTGGAAATTTGGTGACGACACTGTAGGGGAGACTGT
<i>KLK3</i>	390	19q13	TGTGTCACCATGTGGTCCCCTGTTGCTTCTCCTCACCTGTCCGTGACGTGGA
<i>BRCA2</i>	418	13q13	GGCCATGGAATCTGCTGAACAAAAGGAACAAGGTTTATCAAGGGATGTCACAAACCGTGTGGAAGTTGGC
<i>CD27</i>	444	12p13	GAAAGTCTGTGGAGCTGCAGAGCTTGTGCTTACAGCTGCCCAAGGAGG
<i>CTNNB1</i>	475	3p22	GGCTGTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACT
<i>CASR</i>	483	3q21	CCAGTGCTGTAACAAGTGCCAGATGACTTCTGGTCCATGAGAACCACACTCTGCTTATGCAAGGA

Documentos Anexos

Anexo 2: Diseño del panel de genes estudiados por NGS

Gen	NM	Locus	Pos. Crom. Inicial	Pos. Crom. Final	Pares de bases	Amplicones	Cobertura
NRAS	NM_002524.4	1p13.2	115252185	115252310	170	3	100
			115256463	115256578			
			115258687	115258791			
ERBB4	NM_005235.1	2q33.3-q34	212248314	212248394	4207	64	99.6
			212248372	212248462			
			212248442	212248563			
			212248553	212248637			
			212248627	212248737			
			212248727	212248835			
			212251484	212251609			
			212251600	212251730			
			212251708	212251785			
			212251772	212251880			
			212252582	212252701			
			212252680	212252779			
			212285074	212285196			
			212285187	212285263			
			212285253	212285342			
			212286706	212286827			
			212286817	212286934			
			212288830	212288951			
			212288944	212289058			
			212293098	212293158			
			212293148	212293263			
			212295659	212295733			
			212295723	212295839			
			212426581	212426662			
			212426652	212426772			
			212426746	212426863			
			212483872	212483985			
			212483986	212484104			
			212488588	212488682			
			212488672	212488774			
			212495154	212495241			
			212495231	212495348			
			212522455	212522577			
			212530021	212530124			
			212530114	212530229			
			212537875	212537999			
			212543744	212543867			
			212543825	212543930			
			212566613	212566734			
			212566724	212566806			
			212566796	212566902			
			212568778	212568876			
			212568866	212568986			
			212570033	212570115			
			212570105	212570222			
			212576712	212576828			
			212576818	212576926			
212578237	212578305						
212578295	212578401						
212587016	212587134						
212587124	212587222						
212587189	212587260						
212589762	212589887						
212589879	212589987						
212615338	212615455						

Anexo 2: Continuación

			212652706	212652800			
			212652790	212652911			
			212812092	212812171			
			212812161	212812256			
			212812246	212812346			
			212989453	212989530			
			212989520	212989606			
			212989596	212989691			
			213403180	213403263			
HOXD8	NM_0011997	2q31.1	176996158	176996285	25	1	100
ALK	NM_004304.4	2p23	29416390	29416501	200	16	100
			29416532	29416659			
			29430046	29430175			
			29436861	29436982			
			29443555	29443666			
			29446339	29446445			
			29451739	29451871			
			29451884	29451995			
			29456413	29456520			
			29473979	29474109			
			29497943	29498071			
			29498274	29498380			
			29519864	29519975			
			29541176	29541283			
			29754864	29754994			
			29917771	29917888			
MITF	NM_198159.23p14.2-p14.1		69987181	69987255	71	6	100
			69990383	69990505			
			70005568	70005687			
			70008383	70008502			
			70014038	70014143			
			70014175	70014303			
BAP1	NM_004656.33p21.31-p21.2		52436423	52436519	41	3	100
			52437795	52437922			
			52442475	52442601			
PIK3CA	NM_006218.2	3q26.3	178916816	178916934	127	8	100
			178921451	178921570			
			178927934	178928029			
			178936020	178936128			
			178938802	178938919			
			178942500	178942562			
			178951921	178952039			
			178952076	178952196			
KIT	NM_000222.2	4q12	55561699	55561822	208	12	100
			55561857	55561971			
			55564543	55564656			
			55592131	55592244			
			55593388	55593508			
			55593538	55593662			
			55593599	55593700			
			55594136	55594258			
			55595458	55595572			
			55597439	55597559			
			55599266	55599387			
			55602628	55602738			
TERT	NM_198253.2	5p15.33	1293780	1293894	20	1	99

Documentos Anexos

Anexo 2: Continuación

EPHA7	NM_004440.3	6q16.1	93955035	93955104	130	12	100
			93955074	93955193			
			93956503	93956623			
			93967790	93967881			
			93967890	93968010			
			93969039	93969158			
			93979177	93979266			
			93982013	93982138			
			94066440	94066547			
			94067949	94068073			
			94120246	94120360			
94120707	94120830						
STK19	NM_032454.1	6p21.3	31940067	31940184	20	2	100
			31948182	31948296			
BRAF	NM_004333.4	7q34	140434423	140434550	199	5	100
			140453044	140453155			
			140453111	140453233			
			140481395	140481518			
			140549836	140549953			
MET	M_001127500	7q31	116339091	116339210	4427	59	99.3
			116339193	116339290			
			116339279	116339359			
			116339349	116339470			
			116339460	116339578			
			116339539	116339649			
			116339628	116339709			
			116339699	116339800			
			116339790	116339909			
			116339899	116340009			
			116339999	116340120			
			116340107	116340205			
			116340195	116340313			
			116340303	116340389			
			116371680	116371803			
			116371793	116371918			
			116379921	116380035			
			116380025	116380144			
			116380787	116380912			
			116380913	116381040			
			116380995	116381078			
			116381080	116381198			
			116395316	116395441			
			116395428	116395501			
			116395491	116395597			
			116397468	116397581			
			116397570	116397655			
			116397717	116397801			
			116397791	116397884			
			116398425	116398548			
			116398538	116398609			
			116398599	116398680			
			116399329	116399452			
			116399442	116399549			
			116403056	116403132			
			116403122	116403243			
			116403233	116403330			
			116409651	116409753			
			116409743	116409850			
			116411465	116411576			
			116411566	116411683			
			116411673	116411778			

Anexo 2: Continuación

			116411898	116411974			
			116411964	116412069			
			116414880	116414970			
			116414960	116415071			
			116415061	116415179			
			116417424	116417542			
			116418813	116418901			
			116418895	116419016			
			116421932	116422053			
			116422043	116422156			
			116423349	116423423			
			116423413	116423531			
			116435688	116435812			
			116435804	116435870			
			116435869	116435986			
			116435976	116436074			
			116436064	116436183			
GRM3	NM_000840.27q21.1-q21.2		86394475	86394593	495	16	100
			86394559	86394672			
			86394662	86394789			
			86415615	86415717			
			86415895	86416027			
			86416124	86416242			
			86468170	86468291			
			86468281	86468403			
			86468400	86468500			
			86468491	86468605			
			86468596	86468720			
			86468993	86469113			
			86469077	86469197			
			86479688	86479815			
			86479770	86479898			
			86493579	86493698			
RACI	NM_018890.3	7p22	6426853	6426954	20	2	100
			6431542	6431665			
STK31	NM_031414.4	7p15.3	23751819	23751904	281	20	100
			23757152	23757273			
			23768728	23768825			
			23775295	23775404			
			23775370	23775479			
			23792315	23792427			
			23793971	23794094			
			23802381	23802496			
			23809230	23809352			
			23811780	23811870			
			23821041	23821119			
			23823223	23823297			
			23825069	23825187			
			23825135	23825258			
			23826132	23826251			
			23826439	23826511			
			23826481	23826595			
			23827723	23827842			
			23830395	23830510			
			23854708	23854827			
TRAPP	M_001244580	7q21.2-q22.1	98509773	98509845	150	14	100
			98515063	98515192			
			98540527	98540648			
			98555559	98555680			
			98565162	98565253			

Documentos Anexos

Anexo 2: Continuación

			98565269	98565393			
			98567808	98567900			
			98573764	98573886			
			98591331	98591431			
			98592261	98592348			
			98601848	98601969			
			98608937	98609060			
			98609052	98609144			
			98609630	98609748			
PREX2	NM_024870.2	8q13.2	68864508	68864625	5456	85	95.07
			68864773	68864898			
			68930044	68930161			
			68931766	68931865			
			68931855	68931944			
			68934181	68934295			
			68934285	68934390			
			68939418	68939533			
			68939523	68939640			
			68942667	68942791			
			68942781	68942898			
			68950366	68950449			
			68950439	68950532			
			68956632	68956746			
			68956736	68956847			
			68965322	68965434			
			68965428	68965521			
			68968011	68968133			
			68968123	68968219			
			68972843	68972944			
			68972935	68973046			
			68981151	68981265			
			68981294	68981379			
			68982033	68982103			
			68982093	68982177			
			68984656	68984770			
			68984760	68984829			
			68989609	68989727			
			68992649	68992763			
			68992753	68992845			
			68992921	68993041			
			68993012	68993123			
			68995373	68995493			
			68995492	68995591			
			68995581	68995697			
			68999897	69000008			
			68999998	69000098			
			69002791	69002869			
			69002859	69002966			
			69005779	69005870			
			69005860	69005978			
			69009222	69009305			
			69009295	69009373			
			69009363	69009467			
			69011845	69011948			
			69011938	69012055			
			69012058	69012171			
			69017321	69017448			
			69017438	69017526			
			69017516	69017610			
			69020310	69020413			

Anexo 2: Continuación

69020403	69020496						
69020486	69020589						
69021616	69021737						
69021697	69021781						
69027931	69028011						
69028001	69028110						
69028100	69028216						
69030763	69030873						
69030863	69030974						
69031564	69031686						
69031676	69031770						
69032319	69032446						
69032436	69032539						
69033112	69033212						
69033202	69033292						
69039584	69039683						
69046191	69046316						
69046306	69046410						
69046400	69046516						
69050574	69050674						
69050664	69050743						
69050754	69050873						
69058396	69058505						
69058495	69058592						
69069525	69069615						
69069605	69069713						
69103901	69103975						
69103965	69104067						
69104557	69104682						
69104673	69104778						
69129818	69129931						
69129926	69129999						
69136785	69136889						
69143520	69143642						
CDKN2A	NM_058195	9p21	21974591	21974698	10	1	100
GNAQ	NM_002072.4	9q21	80336373	80336488	41	3	100
			80409382	80409502			
			80412434	80412552			
TAF1L	NM_153809.2	9p21.1	32630599	32630725	141	11	100
			32631758	32631878			
			32632034	32632158			
			32632179	32632294			
			32632587	32632722			
			32633752	32633876			
			32633870	32633963			
			32634162	32634280			
			32634460	32634570			
			32634828	32634946			
			32635041	32635141			
PPP6C	NM_002721.4	9q33.3	127911863	127911992	110	6	100
			127912011	127912128			
			127915846	127915974			
			127916199	127916314			
			127920482	127920605			
			127933320	127933442			

Documentos Anexos

Anexo 2: Continuación

PTEN	NM_000314.4	10q23.3	89624206	89624326	1302	18	93.93
			89653766	89653838			
			89653828	89653915			
			89685251	89685367			
			89690729	89690836			
			89690826	89690912			
			89692714	89692826			
			89692816	89692942			
			89692932	89693019			
			89711802	89711921			
			89711895	89712007			
			89717596	89717712			
			89717702	89717784			
			89720564	89720684			
			89720674	89720737			
			89720803	89720912			
89725023	89725131						
89725121	89725234						
HRAS	M_001130442	11p15.5	533782	533882	21	2	100
			534220	534306			
KRAS	NM_033360.3	12p12.1	25362770	25362885	50	4	100
			25378527	25378605			
			25380260	25380337			
			25398189	25398310			
CDK4	NM_000075.3	12q14	58145341	58145449	10	1	100
MAP2K1	NM_002755.3	5q22.1-q22.33	66727414	66727527	162	7	100
			66729055	66729174			
			66729092	66729218			
			66735601	66735680			
			66774071	66774199			
			66777399	66777522			
			66782827	66782955			
MC1R	NM_002386.3	16q24.3	89985788	89985909	110	5	94
			89985900	89986031			
			89986050	89986179			
			89986287	89986376			
			89986533	89986660			
GRIN2A	M_001134407	16p13.2	9856970	9857092	4515	51	97.2
			9857076	9857184			
			9857175	9857297			
			9857285	9857408			
			9857340	9857449			
			9857533	9857650			
			9857641	9857737			
			9857731	9857840			
			9857830	9857928			
			9857951	9858065			
			9858055	9858151			
			9858141	9858260			
			9858250	9858372			
			9858362	9858472			
			9858464	9858590			
			9858581	9858706			
			9858696	9858813			
			9862668	9862794			
			9862785	9862885			
			9862909	9863006			
			9892063	9892192			
			9892193	9892320			
			9892311	9892392			

Anexo 2: Continuación

			9916109	9916207			
			9916197	9916288			
			9923176	9923299			
			9923289	9923413			
			9923403	9923514			
			9927884	9927983			
			9927973	9928097			
			9934451	9934577			
			9934567	9934689			
			9934767	9934869			
			9934859	9934977			
			9943565	9943670			
			9943637	9943741			
			9943735	9943826			
			9984807	9984927			
			9984918	9984994			
			10031791	10031921			
			10031911	10032002			
			10031992	10032096			
			10032076	10032196			
			10032186	10032310			
			10032300	10032413			
			10273771	10273881			
			10273871	10273997			
			10273930	10274043			
			10274032	10274140			
			10274129	10274264			
			10274254	10274334			
ADAMTS18	NM_199355.2	16q23	77326965	77327060	310	21	100
			77326988	77327109			
			77327122	77327226			
			77328919	77328998			
			77331140	77331253			
			77334207	77334335			
			77353766	77353875			
			77353896	77353992			
			77354902	77355028			
			77359710	77359835			
			77389802	77389931			
			77393231	77393356			
			77396013	77396132			
			77396096	77396220			
			77398063	77398173			
			77398146	77398268			
			77401269	77401394			
			77401490	77401571			
			77401514	77401641			
			77465361	77465485			
			77468328	77468404			
NF1	M_001042492	17q11.2	29486000	29486119	431	37	100
			29508719	29508792			
			29509541	29509621			
			29528455	29528572			
			29533266	29533372			
			29552098	29552178			
			29553519	29553618			
			29553552	29553679			
			29554484	29554592			
			29556872	29556963			
			29559057	29559172			
			29559853	29559946			

Documentos Anexos

Anexo 2: Continuación

			29560095	29560216			
			29562583	29562699			
			29562976	29563091			
			29576024	29576131			
			29585442	29585557			
			29586061	29586160			
			29587377	29587494			
			29653083	29653208			
			29654718	29654839			
			29657382	29657480			
			29663261	29663383			
			29663365	29663438			
			29663775	29663898			
			29664473	29664592			
			29670139	29670236			
			29676220	29676319			
			29679198	29679321			
			29683506	29683572			
			29683975	29684092			
			29685414	29685529			
			29685527	29685611			
			29685994	29686061			
			29687520	29687593			
			29687555	29687665			
			29700983	29701110			
GNAI1	NM_002067.4	19p13.3	3114960	3115060	20	2	100
			3118876	3118993			
MAP2K2	NM_030662.3	19p13.3	4101028	4101132	50	4	100
			4102330	4102463			
			4110512	4110641			
			4117526	4117651			
STK11	NM_000455.4	19p13.3	1206991	1207085	100	8	100
			1207066	1207192			
			1218380	1218500			
			1219340	1219473			
			1220385	1220471			
			1221190	1221321			
			1221273	1221381			
			1223004	1223126			
IRS4	NM_003604.2	Xq22.3	107975753	107975861	72	5	100
			107975858	107975985			
			107977709	107977812			
			107978312	107978432			
			107979434	107979557			

Anexo 3: Variantes patogénicas identificadas mediante NGS

Gen	Proteína	Codificante	Posicion chr	Exón	FA (%)	Funcion	COSMIC	Provean	SIFT	Polyphen	SNPS&GO	Condel	
NRAS	Gln62Gln	c.184G>C	chr1:115256527	3	7,65	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	3,00	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	6,81	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	7,40	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	7,55	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	5,00	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	3,00	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Leu	c.182A>T	chr1:115256529	3	23,78	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	6,75	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	18,06	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	3	39,74	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Gln61Lys	c.181C>A	chr1:115256530	3	15,00	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Gln61Lys	c.181C>A	chr1:115256530	3	7,41	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Gln61Lys	c.181C>A	chr1:115256530	3	40,03	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Gln61Lys	c.181C>A	chr1:115256530	3	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Gln61Lys	c.181C>A	chr1:115256530	3	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Gln61Lys	c.181C>A	chr1:115256530	3	16,80	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	HOXD8	Lys254Arg	c.761A>G	chr2:76996228	2	3,17	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
	ERBB4	Pro1297Ser	c.3889C>T	chr2:212248378	28	5,10	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
		Glu1287Lys	c.3859G>A	chr2:212248408	28	4,45	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
Pro1170Ser		c.3508C>T	chr2:212248759	28	18,58	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Pro1025Ser		c.3073C>T	chr2:212285228	25	25,38	Mi	Otros	Del	Dam	Be	Dis	Ne	
Glu1010Lys		c.3028G>A	chr2:212285273	25	6,46	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Ala978Ser		c.2932G>T	chr2:212286764	24	19,91	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne	
Gly918Glu		c.2753G>A	chr2:212288993	23	22,37	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne	
Gly907Glu		c.2720G>A	chr2:212289026	23	4,54	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Glu872Lys		c.2614G>A	chr2:212295699	21	4,38	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Ne	Ne	
Arg847Cys		c.2539C>T	chr2:212295774	21	4,85	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
His801fs		c.2401_2402insC	chr2:212426713	20	4,89	FraI	ND	NA	NA	NA	NA	NA	
Lys745Thr		c.2234A>C	chr2:212483969	19	5,44	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne	
Arg711Cys		c.2131C>T	chr2:212488718	18	8,80	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Glu691Lys		c.2071G>A	chr2:212495195	17	9,01	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Arg684fs		c.2046delG	chr2:212495219	17	6,02	FraDel	ND	NA	NA	NA	NA	NA	
Gln558Lys		c.1672C>A	chr2:212537933	14	7,66	Mi	ND	Ne	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne	
Arg525Pro		c.1574G>C	chr2:212543825	13	4,00	Mi	ND	Ne	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne	
Arg525Pro		c.1574G>C	chr2:212543825	13	3,09	Mi	ND	Ne	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne	
Glu452Lys		c.1354G>A	chr2:212566827	12	9,15	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Glu452Lys		c.1354G>A	chr2:212566827	12	22,98	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
His204Tyr		c.610C>T	chr2:212615376	5	17,15	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Arg106Cys		c.316C>T	chr2:212812260	3	19,10	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg106Cys		c.316C>T	chr2:212812261	3	20,03	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
BAP1		Lys61Arg	c.182A>G	chr3:52442563	4	4,04	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
MITF		Glu318Lys	c.1255G>A	chr3:70014091	10	48,00	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
		Glu318Lys	c.1255G>A	chr3:70014091	10	49,00	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
KIT		Pro524Leu	c.1571C>T	chr4:55593414	10	22,80	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Tyr553Ser	c.1658A>C	chr4:55593592	11	31,80	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
	Leu576Pro	c.1727T>C	chr4:55593661	11	87,56	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Leu576Pro	c.1727T>C	chr4:55593661	11	13,00	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
	Tyr578Cys	c.1733A>G	chr4:55593667	11	43,94	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg804Leu	c.2411G>T	chr4:55599285	17	25,80	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne		
STK19	Thr281Ile	c.842_843delCCinsTT	chr6:3194825	6	29,74	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne	
	Glu88Lys	c.262G>A	chr6:31940120	2	4,10	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Ne	Ne	
EPHA7	Ser951Phe	c.2852C>T	chr6:93955046	16	29,44	Mi	ND	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Ser951Phe	c.2852C>T	chr6:93955046	16	2,73	Mi	ND	Del	Dam	Be	Dis	Del	
	Arg880Gly	c.2638A>G	chr6:93956598	15	7,08	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
	Gly524Arg	c.1570G>A	chr6:93979258	7	40,32	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne	
	Val434Ala	c.1301T>C	chr6:94066458	5	4,40	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
	Glu240Lys	c.718G>A	chr6:94120333	3	6,43	Mi	MM	Ne	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Arg231Ter	c.691C>T	chr6:94120360	3	22,42	No	MM	NA	NA	NA	NA	NA		
Asn2fs	c.245_246insA	chr6:94120805	3	2,00	FraI	ND	Del	Dam	NA	NA	NA		

Documentos Anexos

Anexo 3: Continuación

STK31	Glu443Lys	c.1327G>A	chr7:23702453	11	12,79	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
	Glu553Lys	c.1657G>A	chr7:23709319	13	8,95	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
	Pro624Leu	c.1871C>T	chr7:23711803	15	15,77	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
	Trp645Ter	c.1935G>A	chr7:23711867	15	20,15	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Arg728Gln	c.2183G>A	chr7:23725131	18	42,59	Mi	Otros	Ne	Dam	Pos_Dam	Ne	Del
	Pro744Leu	c.2231C>T	chr7:23725179	18	9,75	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Pro936Ser	c.2806C>T	chr7:23754808	23	33,50	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
GRM3	Asp25Fs	c.69_70insG	chr7:86394530	2	3,78	Fral	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Asp185Asn	c.553G>A	chr7:86415661	3	1,75	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
	Asp279Asn	c.835G>A	chr7:86415943	3	13,16	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
	Asp280Asn	c.838G>A	chr7:86415946	3	6,65	Mi	MM	Del	olerate	Pro_Dam	Ne	Del
	Asp280Asn	c.838G>A	chr7:86415946	3	6,95	Mi	MM	Del	olerate	Pro_Dam	Ne	Del
	Arg612Gln	c.1835G>A	chr7:86468665	4	8,15	Mi	Otros	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del
	Gln829Ter	c.2485C>T	chr7:86479779	5	7,81	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA
TRRAP	Pro814Ser	c.2440C>T	chr7:98515120	20	31,87	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Disease
BRAF	Pro731Ser	c.2191C>T	chr7:140434507	18	18,29	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Lys601Glu	c.1801A>G	chr7:140453134	15	8,60	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
	Lys601Glu	c.1801A>G	chr7:140453134	15	17,00	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
	Lys601Glu	c.1801A>G	chr7:140453134	15	15,01	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
	Lys601Glu	c.1801A>G	chr7:140453134	15	46,37	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	3,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	34,60	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	5,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	16,82	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	45,99	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Lys	c.1798_1799delGTinsAA	chr7:140453136	15	11,32	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	6,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	7,87	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	3,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	5,56	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	22,82	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	6,21	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	7,96	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	5,16	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	9,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	20,86	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Lys	c.1798_1799delGTinsAA	chr7:140453136	15	25,39	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	4,86	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	1,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	15,14	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Lys	c.1798_1799delGTinsAA	chr7:140453136	15	14,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	7,37	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	12,63	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	3,81	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	1,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	10,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	12,92	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	3,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	4,10	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	37,16	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	4,15	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	24,47	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Lys	c.1798_1799delGTinsAA	chr7:140453136	15	9,18	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	4,06	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	17,30	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	9,12	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	13,06	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del

Anexo 3: Continuación

Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Lys	c.1798_1799delGTinsAA	chr7:140453136	15	67,37	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	50,47	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	15,28	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	38,55	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	6,33	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	2,38	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	2,31	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	26,35	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	6,95	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	57,74	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	35,26	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	24,90	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	38,84	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	14,45	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	43,52	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	8,21	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	80,34	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	37,20	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	8,16	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	15	51,62	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Leu597Arg	c.1790T>G	chr7:140453145	15	4,05	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Leu584Phe	c.1750C>T	chr7:140453185	15	23,11	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Gly464Arg	c.1390G>A	chr7:140481418	11	6,81	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
MET											
Pro9Thr	c.25C>A	chr7:116339163	2	47,93	Mi	ND	Ne	Dam	Pos_Dam	Dis	Del
Pro147Thr	c.439C>A	chr7:116339577	2	8,93	Mi	MM	Ne	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
Ser203del	c.606_608delITTC	chr7:116339743	2	49,65	Fral	ND	Del	NA	NA	NA	NA
Arg277Lys	c.830G>A	chr7:116339968	2	6,45	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
Arg277Lys	c.830G>A	chr7:116339968	2	27,81	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
Arg304fs	c.904_905insA	chr7:116340042	2	2,64	Fral	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Thr511Met	c.1532C>T	chr7:116380910	5	44,90	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
Pro570Ser	c.1707_1708delCCinsTT	chr7:116395414	6	3,28	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Gly606Glu	c.1817G>A	chr7:116395524	6	4,32	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Leu833fs	c.2492_2493insC	chr7:116403177	11	6,10	Fral	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Asp946Asn	c.2836G>A	chr7:116411603	13	14,68	Mi	ND	Ne	olerate	Pos_Dam	Dis	Del
Thr1010Ile	c.3029C>T	chr7:116411990	14	36,99	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
Thr1010Ile	c.3029C>T	chr7:116411990	14	58,50	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
Gly1146Arg	c.3436G>A	chr7:116418871	17	7,71	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
Gly1162Arg	c.3484G>A	chr7:116418919	17	3,15	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
RAC1											
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	1,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	1,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	3,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	15,72	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro29Ser	c.85C>T	chr7:6426892	2	57,41	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
Pro69Leu	c.206C>T	chr7:6431653	3	20,82	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
PREX2											
Glu222Lys	c.664G>A	chr8:68942852	6	9,30	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Ne	Del
Glu222Lys	c.664G>A	chr8:68942852	6	37,68	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Ne	Del
Trp234Ter	c.702G>A	chr8:68942890	6	22,96	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Gly250Arg	c.748G>A	chr8:68950436	7	11,61	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
Asp312Asn	c.934G>A	chr8:68956816	8	4,62	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
Asp312Asn	c.934G>A	chr8:68956816	8	1,15	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
Asp312Asn	c.934G>A	chr8:68956816	8	4,09	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
Ala315Thr	c.943G>A	chr8:68956825	8	5,09	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
Trp328Ter	c.984G>A	chr8:68965372	9	19,05	No	MM	NA	NA	NA	NA	NA
Lys364Ile	c.1091A>T	chr8:68965479	9	26,61	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne

Anexo 3: Continuación

	Gly412Arg	c.1234G>A	chr8:68968205	10	5,80	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Leu549Phe	c.1645C>T	chr8:68992680	16	5,10	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Pro681Ser	c.2041C>T	chr8:68999972	19	7,45	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Asn974fs	c.2917_2918insA	chr8:69020545	24	3,14	Fral	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Leu1144Arg	c.3431T>G	chr8:69031676	28	3,36	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Arg1149Cys	c.3445C>T	chr8:69031690	28	15,10	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Pro1222Ser	c.3664C>T	chr8:69033224	30	32,25	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Gly1372Ter	c.4114G>T	chr8:69058470	34	6,54	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Gly1372Glu	c.4115G>A	chr8:69058471	34	3,99	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Gly1399Glu	c.4196G>A	chr8:69058552	34	16,20	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
CDKN2A	Pro48Leu	c.143C>T	chr9:21974684	1	30,86	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
TAF1L	Glu1147Lys	c.3439G>A	chr9:32632139	1	60,83	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
GNAQ	Arg183Gln	c.548G>A	chr9:80412493	4	7,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
PPP6C	Arg264Cys	c.790C>T	chr9:127912080	7	7,44	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Arg264Cys	c.790C>T	chr9:127912080	7	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Arg264Cys	c.790C>T	chr9:127912080	7	2,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Arg264Cys	c.790C>T	chr9:127912080	7	8,75	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Asp193Tyr	c.577G>T	chr9:127915904	6	2,95	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
PTEN	Arg14del	c.40_42delAGG	chr10:89624265	1	52,62	NonFraDel	ND	Del	NA	NA	NA	NA
	Tyr27Ter	c.81T>A	chr10:89653783	2	3,05	No	Otros	NA	NA	NA	NA	NA
	Pro30Ser	c.88C>T	chr10:89653790	2	10,96	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Pro38Ser	c.112C>T	chr10:89653814	2	20,00	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Arg47Lys	c.140G>A	chr10:89653842	2	47,14	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Phe56Val	c.166T>G	chr10:89685271	3	25,59	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Asn63fs	c.183_184insA	chr10:89685288	3	5,02	Fral	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Lys164fs	c.486_487insA	chr10:89693002	5	28,82	Fral	MM	NA	NA	NA	NA	NA
	Arg173His	c.518G>A	chr10:89711900	6	19,41	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Phe278Leu	c.834C>G	chr10:89720683	8	23,04	Mi	Otros	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del
	Phe278Leu	c.834C>G	chr10:89720683	8	22,14	Mi	Otros	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del
	Phe278Leu	c.834C>G	chr10:89720683	8	36,46	Mi	Otros	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del
	Gly282Arg	c.844G>A	chr10:89720693	8	5,10	Mi	ND	Ne	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Phe341fs	c.1023delT	chr10:89720868	8	21,77	NonFraDel	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Thr350fs	c.1043_1044insA	chr10:89725060	9	6,41	Fral	ND	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	Ala146Val	c.437C>T	chr12:25378561	4	10,61	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Gln61Arg	c.182A>G	chr12:25380276	3	61,01	Mi	Otros	Del	Dam	Be	Dis	Del
	Gln61Arg	c.182A>G	chr12:25380276	3	5,30	Mi	Otros	Del	Dam	Be	Dis	Del
	Gly12Val	c.35G>T	chr12:25398284	2	80,80	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
CDK4	Arg24His	c.71G>A	chr12:58145430	2	10,69	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Ne
	Arg24His	c.71G>A	chr12:58145430	2	11,66	Mi	MM	Del	Dam	Be	Dis	Ne
	Arg24Cys	c.70C>T	chr12:58145431	2	6,34	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
	Arg24Cys	c.70C>T	chr12:58145431	2	3,12	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
MAP2K1	e103_Lys104de	c.305_310delAGATCA	chr15:66729096	3	11,53	NonFraDel	ND	Del	NA	NA	NA	NA
MAP2K1	Pro124Leu	c.371C>T	chr15:66729163	3	4,90	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
GRIN2A	Pro1366Leu	c.4097C>T	chr16:9857304	13	8,80	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del
	Pro1366Ser	c.4096C>T	chr16:9857305	13	28,45	Mi	Otros	Del	Dam	Be	Ne	Del
	Ser1232Phe	c.3695C>T	chr16:9857706	13	37,16	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Glu838Lys	c.2512G>A	chr16:9862791	12	4,11	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Glu789Lys	c.2365G>A	chr16:9862938	12	16,70	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Trp771Ter	c.2313G>A	chr16:9892177	11	36,38	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Asp742Asn	c.2224G>A	chr16:9892266	11	3,65	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
	Arg681Gln	c.2042G>A	chr16:9916247	10	6,26	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Arg681Gln	c.2042G>A	chr16:9916247	10	17,18	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Arg681Ter	c.2041C>T	chr16:9916248	10	27,41	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Gln661Ter	c.1981C>T	chr16:9923306	9	18,76	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA
	Met653Ile	c.1959G>A	chr16:9923328	9	41,93	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne
	Gly583Arg	c.1747G>A	chr16:9927992	8	18,15	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Ser245Phe	c.734C>T	chr16:10032089	3	5,95	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Ser245Phe	c.734C>T	chr16:10032089	3	4,20	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Ser232Phe	c.695C>T	chr16:10032128	3	18,37	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Ser224Phe	c.671C>T	chr16:10032152	3	5,93	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Ser150Phe	c.449C>T	chr16:10032374	3	14,12	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del
	Asp88Asn	c.262G>A	chr16:10274007	2	13,81	Mi	Ne	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	Del
	Pro32Ser	c.94C>T	chr16:10274175	2	22,43	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
	Trp7Ter	c.20G>A	chr16:10274249	2	3,45	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA

Anexo 3: Continuación

<i>ADAMST18</i>	Arg1053Trp	c.3157C>T	chr16:77327005	20	4,95	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
	Arg1053Trp	c.3157C>T	chr16:77327005	20	52,65	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
	Pro1027Ser	c.3079C>T	chr16:77327083	20	16,10	Mi	MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne	
	Arg1009Ter	c.3025C>T	chr16:77327137	20	48,71	No	Otros	NA	NA	NA	NA	NA	
	Gly467Glu	c.1400G>A	chr16:77389897	9	13,16	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne	
	Gly377Glu	c.1130G>A	chr16:77396088	7	2,37	Mi	ND	Del	olerate	Pro_Dam	Dis	Del	
	Ser285Leu	c.854C>T	chr16:77398203	5	23,08	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Ne	Del	
	Ser285Leu	c.854C>T	chr16:77398203	5	4,55	Mi	MM	Del	Dam	Pos_Dam	Ne	Del	
	<i>MCLR</i>	Phe451Leu	c.133T>C	chr16:89985799	1	53,40	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne
		Ser83Pro	c.247T>C	chr16:89985913	1	50,10	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne
Asp84Glu		c.252C>A	chr16:89985918	1	47,85	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Gly136Asp		c.407G>A	chr16:89986073	1	50,90	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg142His		c.425G>A	chr16:89986091	1	39,99	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg142His		c.425G>A	chr16:89986091	1	44,19	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg142His		c.425G>A	chr16:89986091	1	46,80	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg142His		c.425G>A	chr16:89986091	1	50,22	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg142His		c.425G>A	chr16:89986091	1	52,87	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg142His		c.425G>A	chr16:89986091	1	42,30	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg151Cys		c.451C>T	chr16:89986117	1	100,00	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg151Cys		c.451C>T	chr16:89986117	1	51,25	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg151Cys		c.451C>T	chr16:89986117	1	53,65	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg151Cys		c.451C>T	chr16:89986117	1	61,25	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg151Cys		c.451C>T	chr16:89986117	1	53,20	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Arg151Cys		c.451C>T	chr16:89986117	1	48,62	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Ile155Thr		c.464T>C	chr16:89986130	1	47,33	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Ile155Thr		c.464T>C	chr16:89986130	1	50,48	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Ile155Thr		c.464T>C	chr16:89986130	1	49,42	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Ile155Thr		c.464T>C	chr16:89986130	1	53,29	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Ile155Thr		c.464T>C	chr16:89986130	1	46,40	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	50,91	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	54,06	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	50,58	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	48,51	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	36,60	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	50,23	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	46,47	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	52,85	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	57,45	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Arg160Trp		c.478C>T	chr16:89986144	1	48,40	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	95,00	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	100,00	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	48,59	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	46,30	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	47,04	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	45,90	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	46,28	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	chr16:89986546	1	48,37	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
Asp294His		c.880G>C	89986546	1	100,00	Mi	Ri MM	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
<i>NFI</i>	Ser82Phe	c.245C>T	chr17:29486068	3	2,45	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne	
	Arg440Ter	c.1318C>T	chr17:29533315	12	7,60	No	MM	NA	NA	NA	NA	NA	
	Arg711Cys	c.2131C>T	chr17:29553582	18	4,71	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Ne	
	Gln1070Ter	c.3208C>T	chr17:29559101	25	23,46	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA	
	Arg1362Ter	c.4084C>T	chr17:29576111	30	45,08	No	MM	NA	NA	NA	NA	NA	
	Arg1362Ter	c.4084C>T	chr17:29576111	30	17,15	No	MM	NA	NA	NA	NA	NA	
	Arg1437Lys	c.4310G>A	chr17:29585498	32	39,56	Mi	ND	Ne	Dam	Be	Dis	Del	
	Trp1512Ter	c.4536G>A	chr17:29587492	34	30,80	No	ND	NA	NA	NA	NA	NA	
	Lys1844Thr	c.5531A>C	chr17:29654779	38	6,31	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Ne	
	Leu1860Pro	c.5579T>C	chr17:29654827	38	36,84	Mi	ND	Del	Dam	Pro_Dam	Dis	Del	
	Thr2196fs	c.6576_6577insGA	chr17:29664534	43	27,09	FraI	ND	NA	NA	NA	NA	NA	
	<i>STK11</i>	Pro280Leu	c.839C>T	chr19:1221316	6	17,68	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Ne	Del
		Pro193Leu	c.578C>T	chr19:3115043	4	15,18	Mi	ND	Del	Dam	Pos_Dam	Dis	Del
<i>MAP2K2</i>	Glu207Lys	c.619G>A	chr19:4101103	6	5,64	Mi	Otros	Del	Dam	Pro_Dam	Ne	Ne	

Mi: Missense; No: Nonsense; FraI: Frameshift insertion; NonFraDel: Non frameshift deletion; MM: Melanoma; ND: No descrita; Ri MM: riesgo melanoma; Del: Deleterious; Ne: neutral; Dam: damaging; Pro_Dam: Probably damaging; Pos_Dam: Possibly damaging; Be: Benign; Dis: disease

Anexo 4: Publicaciones derivadas de la realización de la presente Tesis Doctoral.

- De Unamuno B, Palanca S, Botella R. **Update on melanoma epigenetics.** Curr Opin Oncol. 2015;27:420-6. IP:4,414. Q1
- De Unamuno Bustos B, Murria Estal R, Pérez Simó G, Oliver Martínez V, LLavador Ros M, Palanca Suela S, Botella Estrada R. **Lack of TERT promoter mutations in melanomas with extensive regression.** J Am Acad Dermatol. 2016;74:570-2. IP: 5.621. D1
- De Unamuno Bustos B, Murria Estal R, Pérez Simó G, De Juan I, Rodríguez M, Escutia B, Alegre V, LLavador Ros M, Ballester R, Nagore E, Palanca Suela S, Botella Estrada R. **Towards Personalized Medicine in Melanoma: Implementation of a Clinical Next-Generation Sequencing Panel.** Sci Rep. 2017;7:495.IP: 5,5. D1. PREMIO A LA MEJOR PUBLICACIÓN ORIGINAL (Sección Valenciana 2018).
- De Unamuno Bustos B, Murria Estal R, Pérez Simó G, Alegre V, Ballester R, Sabater V, LLavador Ros M, Palanca Suela S, Botella Estrada R. **Aberrant DNA methylation is associated with aggressive clinicopathological features and poor survival in cutaneous melanoma.** Br J Dermatol. 2018;179:394-404. IP:4,706. D1. PREMIO A LA MEJOR PUBLICACIÓN ORIGINAL (Sección Valenciana 2019)

- De Unamuno Bustos B, Sahuquillo Torralba A, Moles Poveda P, et al. **Telomerase Expression in a Series of Melanocytic Neoplasms**. Actas Dermosifiliogr. 2019;110:212-219.

Anexo 5: Comunicaciones a congresos derivadas de la realización de la presente Tesis Doctoral.

- Blanca de Unamuno, Rosa Murria, Sarai Palanca, Gema Pérez, Antonio Sahuquillo, Anaid Calle, Vicente Oliver, Margarita Llavador, Rafael Botella. **Estudio de la prevalencia de mutaciones en el promotor del gen *TERT* en melanomas con regresión.** VI Symposium del Grupo Español Multidisciplinar en Melanoma (GEM), 19 y 20 de junio de 2015 en Valencia.
- Rosa Murria, Blanca de Unamuno, Gema Pérez, Vicente Oliver, Margarita Llavador, Eva Barragán, Inmaculada De Juan, Miguel Navarro, Rafael Botella Estrada, Sarai Palanca. **Estudio de la prevalencia de mutaciones en el promotor del gen *TERT* en melanomas con regresión. ¿Es la disfunción telomérica un mecanismo adicional de regresión espontánea?** XV Congreso de la SEOM, Madrid del 28-30 de octubre de 2015.
- Blanca de Unamuno, Rosa Murria, Sarai Palanca, Gema Pérez, Antonio Sahuquillo, Anaid Calle, Rosa Ballester, Vicente Oliver, Margarita Llavador, Victor Alegre, Rafael Botella Estrada. **Estudio de la prevalencia de mutaciones en promotor del gen *TERT* en melanomas con regresión.** 41^a Reunión Grupo Español de Dermatopatología (GEDP), Guadalajara, 6-7 de noviembre de 2015.
- Blanca de Unamuno, Rosa Murria, Gema Pérez, Paula Moles, Vicente Oliver, Rosa Ballester, Eduardo Nagore, Margarita

Llavador, Sarai Palanca#, Rafael Botella#. **Aplicación de un panel de genes mediante Next Generation Sequencing en melanomas primarios.** VII Symposium del Grupo Español Multidisciplinar en Melanoma (GEM), 17 y 18 de junio de 2016 en Barcelona.

- Rosa Murria Estal, Blanca de Unamuno, Gema Pérez, Conrad Pujol, Marta Llop Inma de Juan1, Margarita Llavador, Jennifer Piqueras, Sarai Palanca, Rafael Botella. **Papel de los microRNAs en la patogenia del Melanoma.** VII Symposium del Grupo Español Multidisciplinar en Melanoma (GEM), 17 y 18 de junio de 2016 en Barcelona. PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL.
- Blanca de Unamuno, Rosa Murria, Sarai Palanca, Gema Pérez, Paula Moles, Antonio Sahuquillo, Anaid Calle, Jennifer Piqueras, Margarita Llavador, Rafael Botella Estrada. **Estudio de la expresión de telomerasa por inmunohistoquímica en una serie de melanomas primarios.** Presentado en la 42ª Reunión Grupo Español de Dermatopatología (GEDP), celebrada en Gijón los días 4 y 5 de noviembre de 2016.
- Blanca de Unamuno*, Rosa Murria*, Gema Pérez, Begoña Escutia, Inmaculada de Juan, Rosa Ballester, Eduardo Nagore, Margarita Llavador, Sarai Palanca#, Rafael Botella#. (*Co-autoras; # co-senior). **Design and implementation of a custom targeted next-generation sequencing panel in a series of primary melanomas.** 2017 AAD Annual Meeting, Orlando.

Documentos Anexos

- Rosa Murria*, Blanca de Unamuno*, Gema Pérez, Eva Barragán, Marta Llop, Mercedes Rodriguez, Margarita Llavador, Sarai Palanca#, Rafael Botella#. (*Co-autoras; # co-senior). **Role of microRNAs in the pathogenesis of melanoma.** 2017 AAD Anual Meeting, Orlando.
- Blanca de Unamuno Bustos, Rosa Murria Estal, Gema Pérez Simó, Rosa Ballester Sánchez, Víctor Alegre de Miquel, Vicente Sabater Marco, Sarai Palanca Suela y Rafael Botella Estrada. **Perfiles de metilación aberrante en el melanoma. Correlación con las características clínico-patológicas en una serie de melanomas primarios.** 45 Congreso Nacional de Dermatología y Venereología, Madrid del 10 al 13 de mayo del 2017.
- Blanca de Unamuno Bustos*, Rosa Murria*, Gema Pérez, Antonio Sahuquillo, Eva Barragán, Víctor Alegre, Rosa Ballester, Vicente Sabater, Sarai Palanca#, Rafael Botella#. (*Co-autoras; # co-senior). **Estudio de la metilación en genes supresores de tumores en el melanoma.** VIII Symposium del Grupo Español Multidisciplinar en Melanoma (GEM), 16 y 17 de junio de 2017 en Madrid.
- Blanca de Unamuno, Javier Simarro, Sarai Palanca, Gema Pérez, Paula Moles, Antonio Sahuquillo, Anaid Calle, Margarita Llavador, Rafael Botella Estrada. **Diseño y aplicación de un panel de genes mediante next generation sequencing en melanomas.** Presentado en la 43ª Reunión Grupo Español de Dermatopatología (GEDP), celebrada en

Barcelona los días 10 y 11 de noviembre de 2017. PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN.

- Blanca de Unamuno Bustos, Rosa Murria Estal, Antonio Sahuquillo Torralba, Sarai Palanca Suela, Rafael Botella Estrada. **Estudio de la metilación en genes supresores tumorales en una serie de 203 melanomas. Correlación con las características clínico-patológicas y el pronóstico de los pacientes.** Presentado en la XXXI Reunión del Grupo Español Dermato-oncología y cirugía de la AEDV, celebrada en Málaga del 30 de noviembre al 1 de diciembre del 2018.