

NOVEDADES

Novedades en genética del melanoma

Susana Puig^a, Joan Anton Puig-Butille^b, Celia Badenas^b, Francisco Cuellar^{a,c} y Josep Malveyh^a

^aServicio de Dermatología. Unidad de Melanoma. Hospital Clínic. IDIBAPS (Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Suñé). Barcelona. España.

^bServicio d' Genética. Unidad de Melanoma. Hospital Clínic. IDIBAPS (Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Suñé). Barcelona. España.

^cServicio de Dermatología. CONACYT. México.

La incidencia del melanoma maligno cutáneo ha aumentado considerablemente en las últimas décadas y afecta fundamentalmente a poblaciones de origen caucásico.

El melanoma es una enfermedad multifactorial en la que intervienen factores ambientales que actúan sobre una predisposición o susceptibilidad genética heredada. Así pues, un 5-10% de los casos de melanoma se desarrolla en familias con melanoma familiar. Estas familias pueden ser portadoras de mutaciones de susceptibilidad a melanoma en genes de alta penetrancia. Pero la susceptibilidad genética a desarrollar melanoma muy probablemente también está presente en los melanomas esporádicos y estaría determinada por mutaciones o polimorfismos en genes de baja penetrancia. En los últimos 20 años se han realizado múltiples estudios epidemiológicos, de ligamiento, de asociación y mutacionales con la finalidad de conocer la base genética de susceptibilidad a esta neoplasia. En la actualidad se piensa que existen distintas vías para el desarrollo del melanoma. Los melanomas que se desarrollan en el tronco y las extremidades epidemiológicamente se relacionan con exposiciones discontinuas al sol; a nivel molecular presentan con frecuencia mutaciones en *BRAF* o *RAS* en un porcentaje elevado de los casos. Contrariamente, los melanomas que se desarrollan en zonas con exposición continua al sol (predominantemente faciales) raramente presentan mutaciones en *BRAF/RAS* y presentan activación de la ciclina D1. Resulta también especialmente interesante un trabajo epidemiológico en el que se observa un mejor pronóstico en los pacientes de melanoma con exposiciones acumuladas importantes al sol, corrigiendo para el Breslow¹. Así pues parecería haber distintas vías para el desarrollo del melanoma² que dependen de factores genéticos y ambientales y que tienen un distinto pronóstico. Por tanto, unos pacientes tendrían una mayor susceptibilidad al daño inducido por la radiación

Correspondencia: Susana Puig Sardá
Unidad de Melanoma. Servicio de Dermatología.
Villaruel, 160. 08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: spuig@clinic.edu.es

ultravioleta, probablemente asociado a una facilidad proliferativa de los melanocitos, que con dosis bajas de exposición al sol de forma discontinua inducen un desarrollo importante de nevos asociado a un alto riesgo a desarrollar melanoma con dosis no muy elevadas de exposición al sol, y otros pacientes serían mucho más resistentes a la exposición al sol y tan sólo llegan a desarrollar melanoma si se acumulan dosis muy importantes (habitualmente, por exposición continua). El grado de aberraciones cromosómicas en melanomas acrales y en la mucosa es más elevado que en los otros tipos de melanoma, por lo que se piensa que su origen biológico podría ser completamente distinto.

GENES IMPLICADOS EN LA PREDISPOSICIÓN A MELANOMA

En el melanoma familiar se ha demostrado la existencia de un patrón de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. Esta susceptibilidad a melanoma se expresa con la presencia de múltiples casos de melanomas en familiares de primer o segundo grado, habitualmente asociado a múltiples nevos o nevos displásicos. Mediante estudios citogenéticos, moleculares y de ligamiento se han identificado dos genes, *CDKN2A* (9p21) y *CDK4* (12q14), de alta penetrancia, y un gen de baja-media penetrancia (*MC1R*) como genes de susceptibilidad al melanoma y al menos otro *locus* sin gen conocido (1p22).

CDKN2A

El *locus CDKN2A* comprende 4 exones diferentes y codifica dos proteínas que son transcritas en diferentes patas de lectura y modificadas mediante *splicing* alternativo. La transcripción alfa, que comprende el exón 1 alfa, el exón 2 y el exón 3, codifica para p16INK4A y actúa como un gen supresor de tumores que se une a la cinasa dependiente de la ciclina CDK4 y CDK6³, inhibiendo su asociación con la ciclina D1 y evitando la formación del complejo CDK/ciclina D1. Este complejo fosforila la proteína del retinoblastoma y permite a la célula melanocítica la progresión del ciclo celular atravesando el punto de control de la fase G1.

La transcripción beta, que comprende el exón 1 beta y el exón 2, codifica para la proteína p14ARF. Esta proteína regula la función de p53 y la proteína del retinoblastoma uniéndose e inhibiendo la función de HDM2 y, por tanto, favoreciendo la apoptosis y bloqueando la transformación de los melanocitos en células malignas.

Aproximadamente el 40% de las familias con 3 o más casos de melanoma (datos de Genomel que incluyen familias de Europa, América y Australia) son portadoras de mutaciones en *CDKN2A*. En los múltiples estudios realizados, la mayoría de las mutaciones se encuentra en los exones 1 alfa (Australia) y en el exón 2 (Europa), aunque también se han encontrado mutaciones que tan sólo afectan al exón 1 beta⁴. Por otro lado, no existen diferencias claramente significativas entre si la mutación afecta a una transcripción o a ambas⁵, así como tampoco existe una correlación genotipo-fenotipo. El hecho de que el fe-

notipo no se correlacione con el tipo de mutación o el lugar dentro del gen donde ocurra pondría de manifiesto la importancia de los genes modificadores, así como del ambiente, en el desarrollo y la progresión del cáncer.

Existe una diversidad elevada de mutaciones en este gen, a pesar de poseer una secuencia no muy larga. Se han descrito más de 150 mutaciones germinales, de las cuales al menos 10 de ellas son recurrentes (se presentan en un alto porcentaje). Esto no se debe a la existencia de puntos calientes de mutaciones, sino a un origen fundador. De estas mutaciones, 2 (Gly101Trp y Val59Gly) se encuentran mayoritariamente en los países del sur de Europa (España e Italia)⁶⁻¹⁰. Junto con las mutaciones germinales existen estudios que demuestran la asociación entre el riesgo a desarrollar melanoma y algunos polimorfismos de la región 3'UTR.

CDK4

El segundo gen asociado al melanoma es *CDK4*, del que sólo se han descrito mutaciones en 5 familias^{11,12}. Las características fenotípicas de los portadores de mutaciones germinales en *CDK4* no difieren de las familias afectadas con mutaciones en *CDKN2A*, y al igual que éstos, muestran una alta penetrancia de melanoma en los miembros portadores de mutación, así como una correlación débil entre el fenotipo de nevo y el estado del portador. Todas las mutaciones afectan el codón 24 (situado en el exón 2), que participa en la unión de esta proteína con p16INK4A. Al no producirse esta unión, no se inhibe la fosforilación de pRb y la célula continúa el ciclo celular.

GENES DE BAJA PENETRANCIA: MC1R

Se han reportado mutaciones y polimorfismos en genes de baja penetrancia asociados con un mayor riesgo de melanoma esporádico (receptor de la melanocortina-1 [*MC1R*], factor de crecimiento epidérmico [*EGF* (4q25)], receptor de la vitamina D [*VDR* (12q13)], gen M1 glutatión S-transferasa [*GSTM1*(1p13)], citocromo p450 *debrisoquine hydroxylas* [*CYP2D6* (22q13)]^{13,14} y genes del xeroderma pigmentoso [*XP-B*(2q21), *XP-D* (19q13), *XRCC3*(14q32)], pero de todos ellos el que presenta evidencias irrefutables de su implicación es el gen del receptor de la melanocortina-1 (*MC1R*, [16q24]), cuyas variantes polimórficas son causantes del color del cabello. Portadores de variantes de cabello pelirrojo en su secuencia tienen un incremento mayor del 2,2 de desarrollar melanoma maligno¹⁵. Este efecto, en el caso del *MC1R*, es aditivo, de forma que portadores de dos variantes presentan un riesgo de 4,1 a 4,8¹⁶. Variantes en la secuencia del gen actúan como modificadores del riesgo de desarrollar melanoma, incrementando la penetrancia de mutaciones del 50 al 84% y disminuyendo la edad de aparición del melanoma en torno a los 20 años¹⁶.

Estudios de ligamiento en familias también han dado resultados positivos en 1p36, 1p22 y 9p21 (familias que ligan a 9p21 y no tienen mutaciones en *CDKN2A*), lo que sugiere la presencia en estas regiones de otros genes implicados en la susceptibilidad a melanoma.

GENES IMPLICADOS EN EL INICIO Y LA PROGRESIÓN DEL MELANOMA

Genes supresores de tumores

El papel que desempeña el *CDKN2A* en el melanoma esporádico es complejo. Mientras el 50% de los melanomas primarios muestra una pérdida de heterocigosidad en el locus 9p21 (pérdida de una de las dos copias de la región cromosómica donde se encuentra *CDKN2A*), tan sólo un 2-10% de los tumores presenta además mutaciones puntuales en *CDKN2A*^{17,18}, lo que podría indicar que la pérdida completa del gen supresor de tumores (segundo impacto) tendría lugar como un fenómeno epigenético a través de la regulación de la expresión de p16 por mecanismos como la metilación de la región promotora del gen^{19,20} y, por otra parte, que este gen no estaría implicado en las fases iniciales del desarrollo del melanoma. Estudios de expresión indican que se encuentra implicado en estados más avanzados como en estados invasivos o metastásicos. Todos estos datos, junto con la pérdida de heterocigosidad de la región 9p21 en casi la mitad de los melanomas esporádicos pero manteniendo la región de *CDKN2A*²¹, podrían indicar la presencia de otro gen supresor de tumores en esta región, el cual podría estar implicado en el desarrollo inicial del melanoma. Respecto a las modificaciones de este gen en nevos, se ha encontrado que la región 9p21 está frecuentemente delecionada (LOH), lo cual reforzaría la idea del papel que tienen como lesiones precursoras del melanoma. Comparando los porcentajes de LOH entre los diferentes tipos de nevos, los valores más altos corresponden a nevos displásicos. Esto reforzaría la idea de que al perder en estadios iniciales la función de p16 hace que aumente la proliferación del melanocito, incrementando la probabilidad de que el melanocito acumule daños adicionales en la división celular. Pero todavía son necesarios más estudios para establecer la relación entre los nevos displásicos y el inicio del melanoma.

Otro gen supresor de tumores que está implicado en muchos tipos de cáncer es *TP53* (17p13). Éste codifica la proteína p53, que tiene un papel importante tanto en el control del ciclo celular como en el proceso apoptótico y de reparación del ADN. Por eso se han realizado muchos estudios para observar el estado de este gen en los casos de melanoma. La proporción de mutaciones encontradas en líneas celulares y melanomas primarios varía mucho según los estudios (0-24%), pero en cualquier caso la proporción de mutaciones es baja. Por esto la implicación de este gen en el melanoma está todavía en duda. Recientemente se ha descrito que la proteína s100 beta interacciona con *TP53*, secuestrándola en el citoplasma e impidiendo su función a nivel nuclear, lo que podría explicar la poca implicación de esta proteína en la génesis del melanoma. Otros genes supresores de tumores implicados en varios tipos de cáncer, como el gen *APC* (5q21-q22) o *RBI* (13q14.2), se encuentran ocasionalmente mutados en el melanoma²², aunque su importancia en éste está aún por dilucidar.

Oncogenes

Los oncogenes que se encuentran modificados en el melanoma son mayoritariamente los que componen la vía de señalización Ras/MAPK (sobre todo *BRAF* y *NRAS*), los cuales median la respuesta celular a partir de las señales emitidas por los receptores de factores de crecimiento, activando la transcripción de genes necesarios para el crecimiento celular. *BRAF* (7q34) codifica para una proteína serina-cinasa y actúa como primer mediador de la señalización de N-RAS. Ha sido ampliamente estudiado, y se ha encontrado porcentajes de mutaciones entre el 27 y el 70%²³. Ocurren en el dominio cinasa y aproximadamente el 80% se sitúa en el nucleótido 600 (V600E) promoviendo una activación constitutiva de B-RAF. La prevalencia de mutaciones en *BRAF* varía según el subtipo de melanoma. Son raros los casos de mutaciones en melanoma de zonas expuestas crónicamente al sol, o no expuestas/protegidas de la radiación, como por ejemplo melanomas acrales o de la mucosa. Pero el 50% de los melanomas de extensión superficial o nodulares del tronco o las extremidades presenta mutaciones en *BRAF*. En todos los tumores la presencia de la mutación V600E en *BRAF* y las mutaciones en *NRAS* son mutuamente excluyentes; esto indica que ambas mutaciones tendrían el mismo efecto biológico. No queda claro si la presencia de mutaciones en *BRAF* hace aumentar la probabilidad de que el nevo se transforme en melanoma; además, quedan aún por dilucidar la correlación entre mutaciones en este gen y el pronóstico de la enfermedad. *NRAS* (1p13.2) se encuentra también mutado en un 15-30% de los melanomas²³, dependiendo del subtipo histológico y según la localización del cuerpo. En todos los casos, las mutaciones en *BRAF* y *NRAS* ocurren en estadios tempranos del melanoma. Sorprendentemente la frecuencia de nevos con mutaciones en estos genes es elevada (80%), y varía también según el subtipo histológico.

Mediante técnicas como CGH-array se ha comprobado que existen varias regiones genómicas que presentan cambios en el número de copias del ADN. Hay diferencias significativas entre los diferentes tumores según la zona en la cual se desarrollan (zonas expuestas crónicamente a la radiación ultravioleta y zonas protegidas de la radiación). El grado de aberraciones cromosómicas en melanomas acrales y de la mucosa es más elevado que en otro tipo de tumor. La frecuencia de regiones amplificadas es más elevada en estos tipos que en los melanomas situados en zonas crónicamente expuestas. Frecuentemente, melanomas de zonas con exposición crónica a la radiación solar presentan ganancias en el locus *CCND1* (*CYCI*), pérdidas en el brazo largo del cromosoma 4 y ganancias en regiones del cromosoma 22. En cambio, pérdidas en el brazo largo del cromosoma 10 son más frecuentes en los tumores de zonas protegidas. El incremento de copias del gen *CDDN1* se correlaciona inversamente con la frecuencia de mutaciones en *BRAF*, independientemente del tipo de melanoma. Esto sugeriría que en casos sin mutaciones en *BRAF* y *NRAS* la vía se encuentra activada constituti-

vamente a causa de proteínas situadas en esta vía pero situadas por debajo de B-RAF o N-RAS. Estas diferencias, tanto en las alteraciones genéticas como en los genes que se encuentran mutados según el tipo de melanoma, indicarían que hay diferentes vías de desarrollo del melanoma²⁴. Un mejor conocimiento de estas vías de desarrollo del melanoma deberá repercutir en unas mejores conductas de prevención y en el desarrollo de mejores tratamientos específicos para cada tipo de tumor.

BIBLIOGRAFÍA

- Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricke Al, Eberle C, et al. Sun Exposure and Mortality From Melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 1997;3:195-9.
- Rivers JK. Is there more than one road to melanoma? *Lancet.* 2004;363:728-30.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993;366:704-7.
- Rizos H, Puig S, Badenas C, Malvey J, Darmanian AP, Jimenez L, et al. A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene.* 2001;20:5543-7.
- Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Newton Bishop J, Brescic Paillerets B, et al. Geographical Variation in the Penetration of CDKN2A Mutations for Melanoma. *J. Natl Cancer Inst.* 2002;94:894-903.
- Ruiz A, Puig S, Malvey J, Lazaro C, Lynch M, Giménez-Arnau AM, et al. CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. *J Med Genet.* 1999;36:490-3.
- Ciotti P, Struwing JP, Mantelli M, Chompret A, Avril MF, Santi PL, et al. A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. *Am J Hum Genet.* 2000;67:311-9.
- Yakobson E, Shlomit E, Isaacson R, Halle D, Levylahad E, Catane R, et al. A single Mediterranean, possibly Jewish, origin for the Val59Gly CDKN2A mutation in four melanoma-prone families. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:288-96.
- Puig S, Malvey J, Badenas C, Ruiz A, Jiménez D, Cuellar F, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol.* 2005;23:3043-51.
- Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996;12:97-9.
- Nagore E, Montoro A, Oltra S, Ledesma E, Botella-Estrada R, Millan JM, et al. Age does not appear to be a major indicator of CDKN2A or CDK4 mutations in melanoma patients in Spain. *Melanoma Res.* 2005;15:555-8.
- Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombled J, Spatz A, et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet.* 1998;7:209-16.
- Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene.* 2003;22:3053-62.
- Stahl S, Bar-Meir E, Friedman E, Regev E, Orenstein A, Winkler E, et al. Genetics in Melanoma. *Ist Med Assoc J.* 2004;6:774-7.
- Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene.* 2003;22:3042-52.
- Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA, et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet.* 2001;69:765-73.
- Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, et al. Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res.* 1996;56:5023-32.
- Ruiz A, Puig S, Lynch M, Castel T, Estivill X. Retention of the CDKN2A locus and low frequency of point mutations in primary and metastatic cutaneous malignant melanoma. *Int. J. Cancer.* 1998;76:312-6.
- Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res.* 1996;56:2405-10.
- Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 1995;55:4531-5.
- Puig S, Ruiz A, Lazaro C, Castel T, Lynch M, Palou J, et al. Chromosome 9p deletions in cutaneous malignant melanoma tumors: the minimal deleted region involves markers outside the p16 (CDKN2) gene. *Am J Hum Genet.* 1995;57:395-402.
- De Snoo FA, Hayward NK. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Letters.* 2005;230:153-86.
- Gray-Schopfer VC, Da Rocha Dias S, Marais R. The role of B-RAF in melanoma, *Cancer and Metastasis Reviews.* 2005;24:165-83.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2135-47.