

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN ESPECIALIDADES MÉDICAS**



**UTILIDAD DE LA HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA EN EL
DIAGNÓSTICO DE LOS MELANOMAS Y TUMORES MELANOCÍTICOS
CUTÁNEOS**

**Revisión bibliográfica sometida a la consideración de la Comisión
del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades
Médicas para optar al grado y título de Especialista en Anatomía
Patológica**

ALBERTH JOSUÉ ELIZONDO CERDAS

**SERVICIO DE PATOLOGÍA, HOSPITAL DR. MAXIMILIANO PERALTA JIMÉNEZ
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSÉ, COSTA RICA**

2018

DEDICATORIA

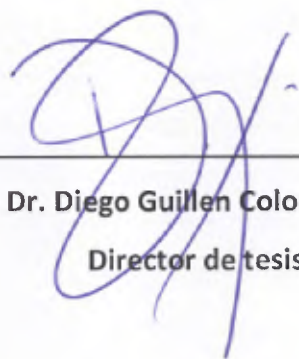
A mis padres, mis modelos a seguir. Esto es gracias a ustedes.

A Silvia mi esposa, por su apoyo incondicional.

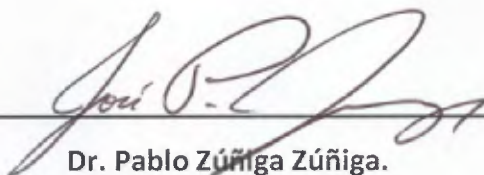
AGRADECIMIENTOS

A mis maestros académicos,
Dr Fernando Mena Umaña, Dr Diego Guillén Colombari, Dr Rafael Portuguez
Barboza,
quienes admiro y respeto.

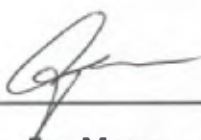
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades Médicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Anatomía Patológica.”



Dr. Diego Guillen Colombari.
Director de tesis



Dr. Pablo Zúñiga Zúñiga.
Asesor de tesis



Dra. Eva Moreno.

Directora de Programa de Posgrado en Especialidad en Anatomía Patológica



Alberth Josué Elizondo Cerdas
Candidato

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDOS.....	V
OBJETIVO GENERAL.....	VI
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO.....	11
MELANOMAS	14
NEVUS MELANOCÍTICOS BENIGNOS	18
TUMORES MELANOCÍTICOS SPITZOIDES.....	20
CGH COMO PREDICTOR DEL PRONÓSTICO DE LOS MELANOMAS.....	23
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características moleculares de los melanomas por medio de la técnica de hibridación genómica comparada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mencionar las características clínicas e histopatológicas del melanoma.
2. Nombrar las características moleculares y genéticas de los melanomas.
3. Citar el proceso, usos, ventajas, desventajas, sensibilidad y especificidad de la hibridación genómica comparada.
4. Identificar las aberraciones cromosómicas presentes en los melanomas detectadas por hibridación genómica comparada y la importancia de su correcta interpretación.
5. Definir las alteraciones cromosómicas de las lesiones melanocíticas benignas y establecer las diferencias de estas con las del melanoma.
6. Establecer la importancia de la hibridación genómica comparada como factor pronóstico en los melanomas.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: *representación esquemática de los principales pasos en la CGH. A la izquierda se muestran los principales pasos de la CGH tradicional, y la derecha los pasos de la CGH a base de matriz.*

Página 13.

FIGURA 2: *análisis de nevus melanocítico y melanoma por hibridación genómica comparada, no hay aberraciones en el nevus. Múltiples copias de ganancias y pérdidas se han encontrado en el melanoma.*

Página 15.

FIGURA 3: *diferencia en el número de copias en melanomas (A) y nevus melanocíticos. El eje γ muestra la proporción en el incremento en el número de copias (verde) y pérdidas (rojo).*

Página 16.

FIGURA 4: *Comparación en la frecuencia de aberraciones en cada locus genómico entre diferentes tipos de melanomas. A: frecuencias de ganancias (arriba) y pérdidas (abajo) de melanomas acrales (verde) versus no acrales (rojo). B: melanomas en pieles con daño solar crónico (verde) versus sin daño solar crónico (rojo). C: melanoma lentigo maligno (verde) versus de extensión superficial (rojo). Asterisco negro indica regiones con marcada diferencias entre grupos. Asteriscos rojos fueron significativos en múltiples pruebas.*

Página 16.

FIGURA 5: *aberraciones genómicas frecuentes en tumores melanocíticos cutáneos.*

Página 17.

FIGURA 6: *Análisis CGH en nódulo proliferativo que ocurre secundario a un nevus melanocítico en paciente de 3 años. Hay ganancias cromosómicas completas en cromosomas 4, 8, 11, 18, 20 y ganancias pequeñas en 21 y 22.*

Página 20.

FIGURA 7: *Tumor de Spitz desmoplásico que muestra mutación de HRAS y ganancia en el brazo corto del cromosoma 11.*

Página 22.

FIGURA 8: resultados CGH de tumores de Spitz ALK positivos. Los paneles superiores muestran la frecuencia del número de copias de cada posición genómica indicando pérdida recurrente de cromosomas 1p, 2p, 6p. Casos 9, 25 y 27 demuestran delección en la región 2p entre ALK y DCTN1 sugestivo de fusión DCTN1-ALK.

Página 23.

FIGURA 9: curvas de supervivencia de 6 pacientes con ganancia de 6p y 14 pacientes sin la ganancia de 6p. B: Curvas de supervivencia de 5 pacientes con ganancia 1q y 15 pacientes sin la ganancia de 1q.

Página 24.

FIGURA 10: Aberraciones cromosómicas en melanomas con buen y pobre pronóstico A: frecuencia de número de ganancias (verde) y pérdidas (rojo) identificados en CGH en melanomas de buen y mal pronóstico. B: número de alteraciones de copias en cada muestra como función de pronóstico.

Página 25.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: *definición histológica de los tipos de proliferaciones de los nevus congénitos.*

Página 18.

TABLA 2: *Comparación de las aberraciones cromosómicas en los nódulos proliferativos en nevus melanocíticos congénitos y aquellos en un melanoma primario cutáneo.*

Página 18.

LISTA DE ABREVIATURAS

CGH: Hibridación genómica comparada.

FISH: hibridación fluorescente in situ.

LMM: melanoma lentigo maligno.

SSM: Melanoma de extensión superficial.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

INTRODUCCIÓN

Las primeras descripciones del melanoma se remontan al siglo V antes de Cristo, y se atribuyen a Hipócrates cuando hacía referencia a un “tumor negro fatal” ⁶.

El melanoma se origina de los melanocitos, células derivadas de la cresta neural y están localizados en todos los tejidos, lo que explica porqué clínicamente puede presentarse en cualquier órgano. La frecuencia del melanoma se ha incrementado desde hace aproximadamente 20 años. Es una enfermedad multietiológica. En personas genéticamente susceptibles hay factores ambientales que favorecen su desarrollo ⁷.

En general, cualquier tumor es derivado de una única célula que ha acumulado una serie de eventos y cambios genéticos necesarios para su desarrollo. Conforme el tumor progresa, otras alteraciones genéticas se consolidan sucesivamente.

Diferentes tumores, incluso aquellos dentro de un mismo órgano, tienen diferentes alteraciones genéticas, por lo que no deberían ser tratados con una terapia estándar, sino más bien, para alcanzar la terapia efectiva, los tumores deberían ser clasificados en subtipos patogenéticos ⁸.

Se reconoce que estudios citogenéticos moleculares son valiosos para estimar el comportamiento biológico de los tumores en cada paciente; y que el número de copias de aberraciones del ADN incrementan con la progresión tumoral, llevando al concepto de estadiaje genético de los tumores malignos ⁸.

El conocimiento de las anormalidades está siendo esencial en la contribución en el diagnóstico y pronóstico de los cánceres, pero también como monitoreo para enfermedad residual mínima o recaída ⁹.

La hibridación genómica comparada cuantifica en el ADN en estudio y lo compara con un ADN control, y esto puede hacerse en cualquier parte del genoma ⁸. El objetivo de este trabajo final de graduación es revisar la utilidad de la hibridación genómica comparada en el diagnóstico y pronóstico de las lesiones melanocíticas, principalmente el melanoma.

MARCO TEÓRICO

Aunque el melanoma representa solo el 10% de todos los cánceres de piel diagnosticados, este representa al menos el 65% de todas las muertes relacionadas con el cáncer de piel. Como la incidencia del cáncer de piel sigue en aumento, ahora más que nunca, los clínicos y los patólogos deben de estar familiarizados con las variadas características clínicas y patológicas ¹.

En el presente, representa el 4 % y 5% de todas las nuevas malignidades en mujeres y hombres respectivamente. Aunque el melanoma es predominantemente en adultos, ocasionalmente se presenta en niños, siendo en este último, más frecuente en los pacientes con xerodermia pigmentaria, síndrome de nevus displásico, nevus congénito en “traje de baño” y melanoma familiar. El melanoma puede originarse de un nevus melanocítico benigno preexistente (congénito o adquirido), de un nevus displásico, originarse de novo o rara vez evolucionar dentro de un nevus azul celular u otras dendrocitosis dérmicas ².

Cuatro subtipos mayores o principales de melanoma cutáneo son actualmente reconocidos, (a) melanoma lentigo maligno, (b) melanoma de extensión superficial, (c) melanoma acral lentiginoso y (d) melanoma nodular. A la inversa, en algunos melanomas no es posible hacer una clasificación precisa, en tales casos, un diagnóstico de melanoma no clasificable es suficiente ².

Si bien el melanoma puede ser fuertemente sospechado con las características clínicas del tumor, requiere un diagnóstico definitivo patológico con la examinación del tejido por biopsia. El diagnóstico patológico recae en el balance de al menos 20 características arquitecturales y citológicas, junto a las respuestas del huésped y debe ser correlacionado con las características clínicas como la edad y sitio anatómico de la lesión ³.

El análisis histológico del melanoma primario provee información pronóstica importante que es también crítico para el manejo futuro del paciente y la valoración de márgenes. El pronóstico de un paciente está principalmente correlacionado con su profundidad de invasión (grosor de Breslow). Sin embargo, otros factores son de importancia como el índice mitótico, la presencia de ulceración, nivel de Clark, sitio anatómico, microsatelitosis, estado de ganglios linfáticos y linfocitos intra tumorales ^{3,4}.

Los linfocitos intra tumorales han sido identificados como un marcador pronóstico favorable entre múltiples cánceres incluyendo mama, ovario, colon y pueden indicar la respuesta inmune del huésped ante el tumor. Mientras varios estudios han evaluado el valor pronóstico de los linfocitos intra tumorales en el melanoma primario, los resultados de la literatura siguen siendo controversiales^{4,5}.

En el caso del melanoma, los linfocitos infiltrando al tumor se clasifican en ausente, no intenso e intenso⁵.

Aproximadamente el 10% de los melanomas son familiares o hereditarios, significando que hay una fuerte historia familiar o mutación documentada. La mayoría de los melanomas familiares son heredados de forma autosómica dominante¹⁰.

De los genes de alto riesgo, mutación en el CDKN2A y CDK4 son los más comunes.

CDKN2A es el locus más estudiado en los melanomas familiares y fue reportado por primera vez en 1992, que se localiza en el cromosoma 9p21 y está presente en el 40% de los melanomas familiares estudiados, pero si a esto se combina el hecho de tener la mutación y además la historia familiar de melanomas, el riesgo acumulado de desarrollar melanoma para la edad de 80 años es del 91% ; mientras que la mutación del CDK4 sólo en el 1% de estos casos, pero poseen el mismo riesgo de desarrollo del melanoma que el CDKN2A¹⁰.

En relación a la patogénesis, son muchas las vías de señalización que se han identificado, siendo las principales las NRAS, HRAS, BRAF, BAP 1 entre otros.

Análisis genómicos y genéticos de los tumores melanocíticos han abierto nuevas oportunidades para mejorar el diagnóstico certero entre la distinción entre nevus y melanomas. El diagnóstico histopatológico en secciones de tejidos teñidos con hematoxilina y eosina y la correlación con el contexto clínico sigue siendo el “gold standard” en el diagnóstico del melanoma. Dermatopatólogos con experiencia pueden hacer una distinción definitiva, reproducible y de confianza entre nevus melanocíticos y melanomas en las mayorías de los casos. Sin embargo, hay ciertas lesiones con hallazgos histopatológicos inusuales y/o conflictivos¹¹.

El diagnóstico de tumores melanocíticos persiste como un campo de reto, si no es que es el área más controversial en la dermatopatología, y el análisis convencional por microscopio

tiene sus limitaciones en definir la entidad precisa. Además, los criterios diagnósticos y los enfoques de diagnóstico varían considerablemente en todo el campo, y debido al miedo al infradiagnóstico, el diagnóstico de melanoma es comúnmente realizado ¹².

En estos casos, cuando existe discordancia o la inhabilidad de hacer un diagnóstico definitivo basado en secciones de rutina, es cuando los patólogos exploran el uso de nuevas técnicas para mejorar la exactitud diagnóstica para los tumores melanocíticos problemáticos ¹¹. Incluso cuando el diagnóstico del melanoma se ha establecido, no todos los melanomas son iguales. Diferentes subtipos mutacionales se han identificado, entre ellos los melanomas BRAF mutados, RAS mutado, NF1 mutado y los triple wild type ²⁶. Esta subclasificación ha sido de relevancia para la selección terapéutica óptima para los pacientes ¹¹.

La hibridación genómica comparada (CGH) es un método que detecta el número de copias a través del genoma. El ADN total genómico aislado del tumor es etiquetado con diferentes fluorocromos (figura 1). El número de copias de ganancias y pérdidas son identificadas en base a la variedad de la intensidad de la fluorescencia.

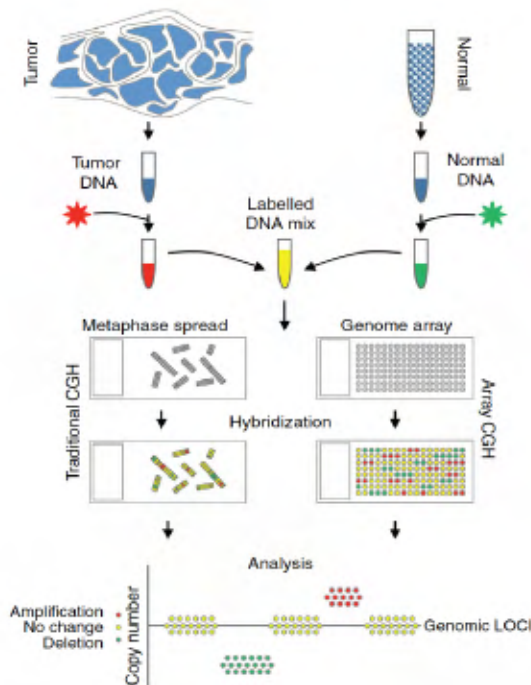


Figura 1: Representación esquemática de los principales pasos en la CGH. A la izquierda se muestran los principales pasos de la CGH tradicional, y la derecha los pasos de la CGH a base de matriz. Nagarajan P, Tetzlaff M, Curry J, Prieto V. Use of New Techniques in Addition to IHC Applied to the Diagnosis of Melanocytic Lesions, With Emphasis on CGH, FISH, and Mass Spectrometry. Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition). 2017;108(1):17-30.

MELANOMAS

El análisis de los tumores melanocíticos por CGH ha revelado que los nevos y los melanomas difieren citogenéticamente. La vasta mayoría de los melanomas muestran patrones recurrentes de aberraciones cromosómicas, como la pérdida de los cromosomas 6q, 8p, 9p y 10q además de ganancias del 1q, 6p, 7, 8q, 17q y 20q. En contraste, la mayoría de las lesiones névicas melanocíticas carecen de número de copias detectables por CGH ¹¹.

CGH ha sido y lo es actualmente la herramienta más utilizada para el diagnóstico de lesiones melanocíticas spitzoides problemáticas, además de lesiones no spitzoides (nevus azul atípico, esclerosante o nevus penetrante profundo). Este estudio se puede realizar en tejido fijado en formalina o parafinado.

En contraste con la información obtenida tan dirigida del FISH, el CGH provee un status del número de copias cromosómicas de forma comprensiva del genoma. Entre sus desventajas incluye la disponibilidad en los centros de salud, análisis limitado por la baja carga tumoral y la imposibilidad de método análisis in situ ¹².

El potencial de la CGH en la clasificación de las lesiones melanocíticas inició con el trabajo de Bastian et al, quien analizó 32 melanomas primarios ¹³.

Bastian et al, observó diferencias significativas en el patrón de aberración de diferentes tipos de lesiones melanocíticas. Las diferencias más pronunciadas fueron observadas entre los nevos y melanomas, en los que se observó dos patrones distintos con poco traslape (figura 2 y 3). Mientras que la gran mayoría de los melanomas (96,2%) mostraron al menos una aberración, a diferencia de los nevos. El claro corte de diferencias entre un nevus y un melanoma puede indicar que las aberraciones cromosómicas son características esenciales en la mayoría de los melanomas ¹⁴.

El hecho de que de que el poco traslape en los patrones de aberración entre melanomas y nevos indican que la detección en el cambio de este número de copias sea una herramienta diagnóstica útil. El número significativo de melanomas en este estudio también permitió comparar los patrones de aberración de los diferentes tipos de melanoma. Por ejemplo (figura 4), se comparó los melanomas de zonas acrales (palma, planta y subungueales) con los melanomas no acrales. El grupo de los melanomas acrales presentaban con más

frecuencia un incremento en el número de copias en el cromosoma 5p (36.4% versus 4.6% de los melanomas no acrales), en 4q (18.2% versus 0.9%) y 11q (36.4% versus 9.3%), así como pérdidas de cromosomas 6q (50% versus 19.4%), en 15q (22.7% versus 0.9%) y 16q (36.4% versus 10.2%)¹⁴.

Además, se comparó las aberraciones cromosómicas entre los melanomas lentigo maligno (LMM) y melanomas de extensión superficial (SSM). LMM son más frecuentes que tengan ganancias en 15q (20% versus 0% de SSM) y 17q (40% versus 11.5%), y pérdidas más frecuentes en 13q (32% versus 5.8%) y 17p (36% versus 3.8%)¹⁴.

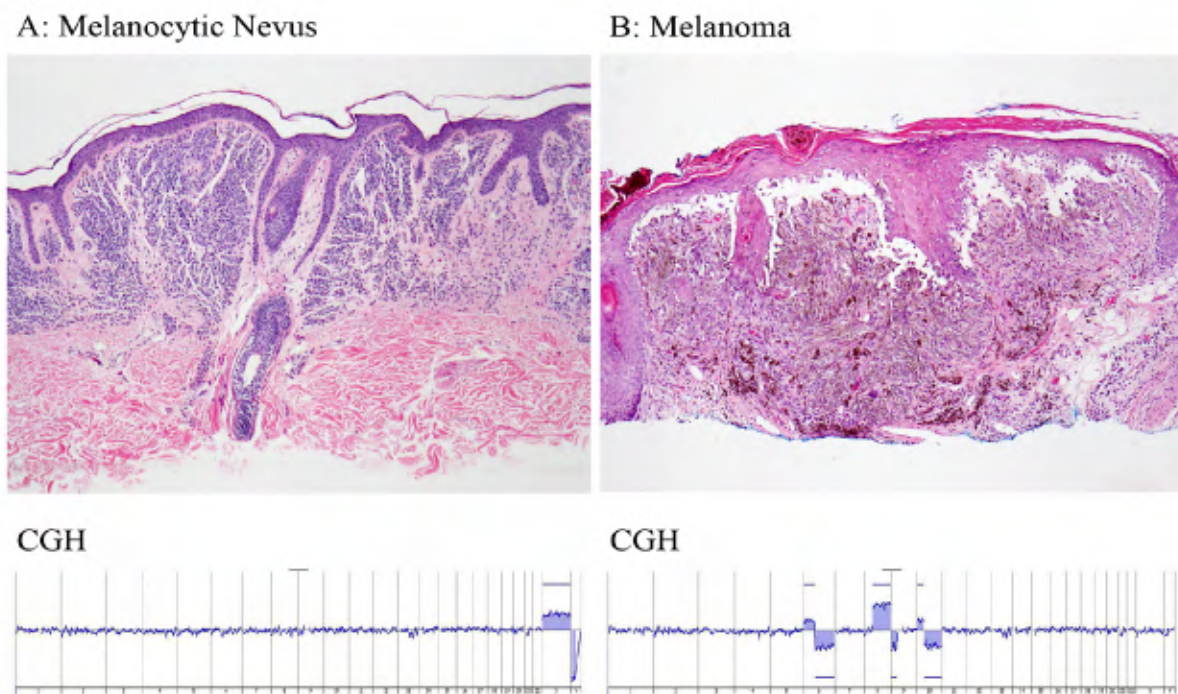


Figura 2: Análisis de nevus melanocítico y melanoma por hibridación genómica comparada, no hay aberraciones en el nevus. Múltiples copias de ganancias y pérdidas se han encontrado en el melanoma. Busam K. Molecular pathology of melanocytic tumors. Seminars in Diagnostic Pathology. 2013;30(4):362-374.

Como ya se mencionó anteriormente, los melanomas presentan pérdidas en el cromosoma 9 (81%, la mayoría en el brazo p), 10 (63%), 6q (28%) y 8p (22%). Y ganancias en los cromosomas 7 (50%), 8 (34%), 6p (28%), 1q (25%), 20 (13%), 17 (13%) y 2 (13%). Dentro de las primeras alteraciones, las pérdidas del cromosoma 9 y 10 ocurren de forma temprana

en la progresión del melanoma, mientras que la ganancia del cromosoma 7 ocurre en una etapa más avanzada ¹⁵. Los melanomas acrales muestran una amplificación genómica más

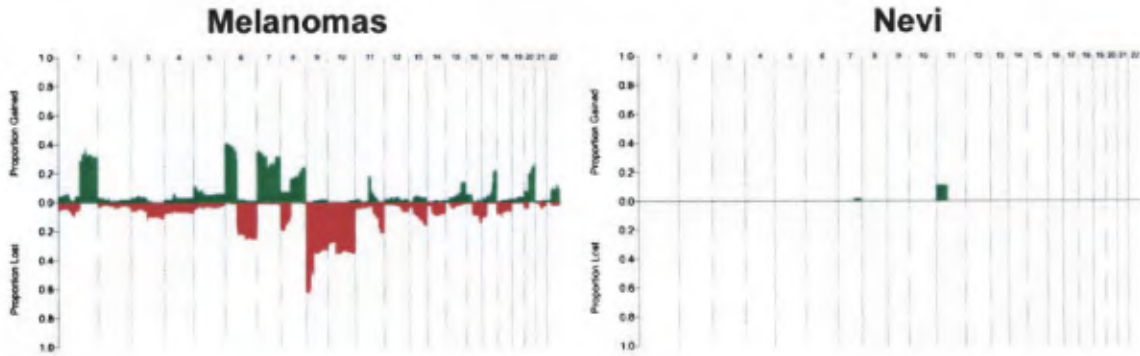


Figura 3: diferencia en el número de copias en melanomas (A) y nevi melanocíticos. El eje y muestra la proporción en el incremento en el número de copias (verde) y pérdidas (rojo). Bastian B, Olshen A, LeBoit P, Pinkel D. *Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number Changes. The American Journal of Pathology. 2003;163(5):1765-1770.*

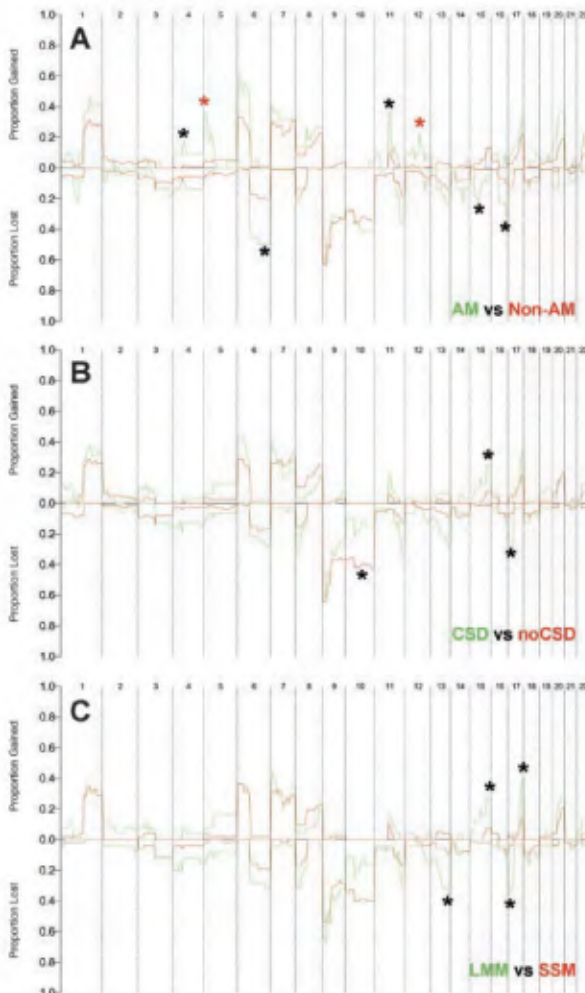


Figura 4: Comparación en la frecuencia de aberraciones en cada locus genómico entre diferentes tipos de melanomas. A: frecuencias de ganancias (arriba) y pérdidas (abajo) de melanomas acrales (verde) versus no acrales (rojo). B: melanomas en pieles con daño solar crónico (verde) versus sin daño solar crónico (rojo). C: melanoma lentigo maligno (verde) versus de extensión superficial (rojo). Asterisco negro indica regiones con marcada diferencias entre grupos. Asteriscos rojos fueron significativos en múltiples pruebas. Bastian B, Olshen A, LeBoit P, Pinkel D. *Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number Changes. The American Journal of Pathology. 2003;163(5):1765-1770.*

AM: melanoma acral
 Non-AM: melanoma no acral
 CSD: daño solar crónico
 noCSD: sin daño solar crónico
 LMM: melanoma lentigo maligno
 SSM: melanoma extensión superficial

significativa en comparación con los melanomas de extensión superficial. Y las regiones más frecuentemente amplificadas en estos melanomas acrales son 11q13 (47%), 22q11-13 (40%) y 5p15 (20%)¹⁵.

La CGH, además de analizar las alteraciones genómicas, también se puede emplear para determinar el status mutacional del BRAF y NRAS. Curtin et al¹⁶ analizó 126 melanomas y encontró patrones distintos en pieles con daño solar crónico, piel sin daño solar crónico, pieles acrales y sitios de mucosa. Estas diferencias son más pronunciadas entre los melanomas que tienen protección relativa o absoluta del sol (acral y de mucosa) y melanomas de piel con varios grados de exposición al sol.

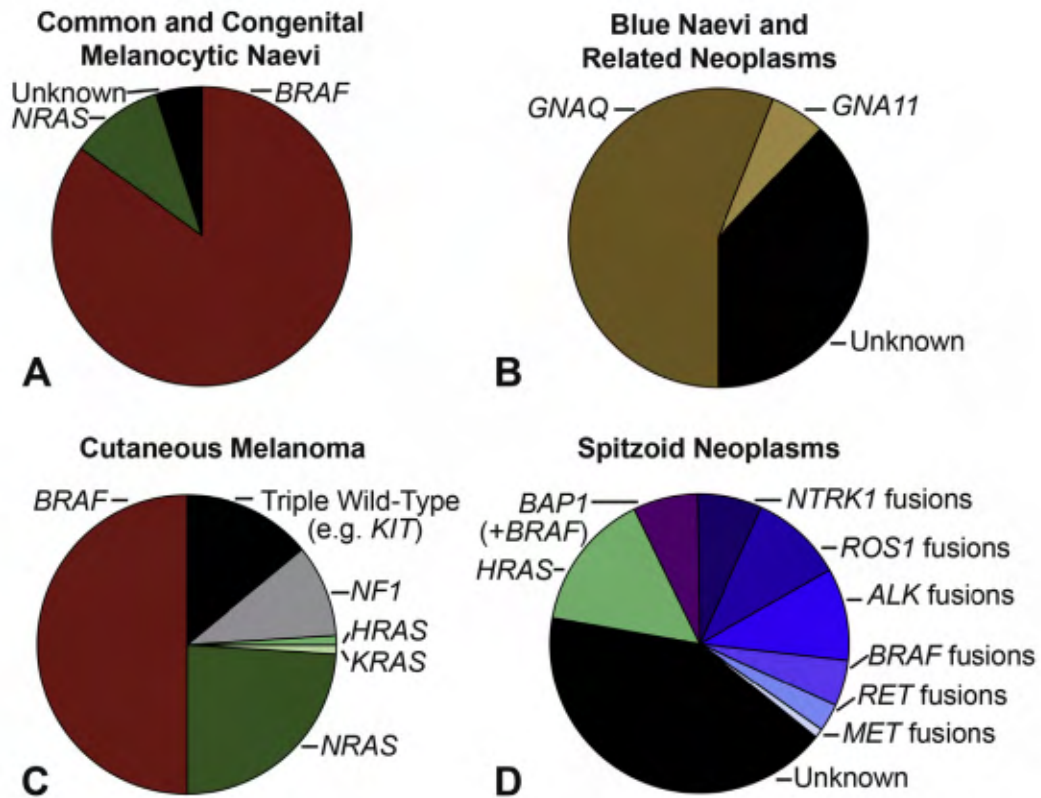


Figura 5: Aberraciones genómicas frecuentes en tumores melanocíticos cutáneos. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm M, Busam K, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. Pathology. 2016;48(2):113-131.

NEVUS MELANOCÍTICOS BENIGNOS

Los nevos melanocíticos comunes surgen predominantemente en las tres primeras décadas de vida y normalmente son simétricos y miden menos de 6 mm en las pieles foto expuestas ¹⁷.

La vasta mayoría (>80%) muestran activación de mutaciones llevando al cambio de un aminoácido en el codón 600 de BRAF (BRAF ^{V600E/K})¹⁷.

Los nevos congénitos surgen in útero o postnatal y a menudo muestran activación del NRAS (75%) en el codón 61 ¹⁷. Los nevos azules y lesiones relacionadas son proliferaciones melanocíticas heterogéneas que varían de tamaño en unos milímetros hasta varios centímetros. La mayoría muestran una morfología dendrítica característica intradérmico, y muestran activaciones del GNAQ o GNA11, afectando comúnmente el codón 209 ¹⁷.

Bastian et al analizó las aberraciones cromosómicas en diferentes tipos de proliferaciones que surgen en un nevus congénito. Los casos fueron asignados en 6 grupos acorde a los siguientes patrones histológicos: sin características atípicas (grupo I), con focos de celularidad aumentada (grupo II), con proliferación simulando un melanoma de extensión superficial in situ (grupo III), con proliferación simulando un melanoma nodular (grupo IV), hamartoma neurocrístico (grupo V) y melanoma surgiendo de nevus congénito. Ninguna aberración fue encontrada en los grupos I, II, III. Por el otro lado, aberraciones completas fueron observadas en los cromosomas IV y V, lo cual difirió significativamente de las variadas aberraciones encontradas en el grupo VI ^{15,18} (tabla 1,2).

Magro et al utilizó CGH para analizar seis nevos penetrantes profundos, y todos los seis tumores tuvieron un perfil citogenético normal ¹⁵.

Como ya se mencionó, múltiples ganancias o pérdidas cromosómicas completas pueden identificarse secundariamente en nevos congénitos, típicamente en los de gran tamaño en la infancia o niñez temprana ^{12,18,20}(figura 6).

Group I	Congenital nevus, superficial or superficial and deep type
Group II	Congenital nevus, superficial or superficial and deep type, with superficial dermal foci of increased cellularity
Group III	Congenital nevus, superficial or superficial and deep type, with marked intraepidermal upward scatter and large junctional nests of melanocytes simulating superficial spreading melanoma
Group IV	Congenital nevus, superficial or deep type, with nodular proliferations of high cellularity, nuclear atypia, and markedly increased proliferation rate
Group V	Features of proliferative neurocristic hamartoma with nests of epitheloid melanocytes surrounded by a loose myxoid stroma with spindle cells
Group VI	Melanoma arising in a congenital nevus

Tabla 1: Definición histológica de los tipos de proliferaciones de los nevus congénitos. Bastian B, Xiong J, Frieden I, Williams M, Chou P, Busam K et al. Genetic Changes in Neoplasms Arising in Congenital Melanocytic Nevi. The American Journal of Pathology. 2002;161(4):1163-1169.

	n	Loss of 9	Loss of 10	Loss of 7	No aberrations	Whole chromosomes only	Whole and partial chromosomes	Partial chromosomes only
Proliferative nodules in CMN	10	2 (20%)	2 (20%)	3 (30%)	2 (22%)	6 (66%)	0 (0%)	1 (11%)
Primary cutaneous melanoma	122	73 (60%)	71 (58%)	0 (0%)	6 (5%)	5 (4%)	72 (59%)	45 (37%)

Tabla 2: Comparación de las aberraciones cromosómicas en los nódulos proliferativos en nevus melanocíticos congénitos y aquellos en un melanoma primario cutáneo. Bastian B, Xiong J, Frieden I, Williams M, Chou P, Busam K et al. Genetic Changes in Neoplasms Arising in Congenital Melanocytic Nevi. The American Journal of Pathology. 2002;161(4):1163-1169.

Estas ganancias o pérdidas completas de cromosomas no pueden utilizarse como soporte molecular para el diagnóstico de melanomas. Mientras que el diagnóstico de un nódulo proliferativo atípico se debe realizar en aquellos contextos no pediátricos ¹².

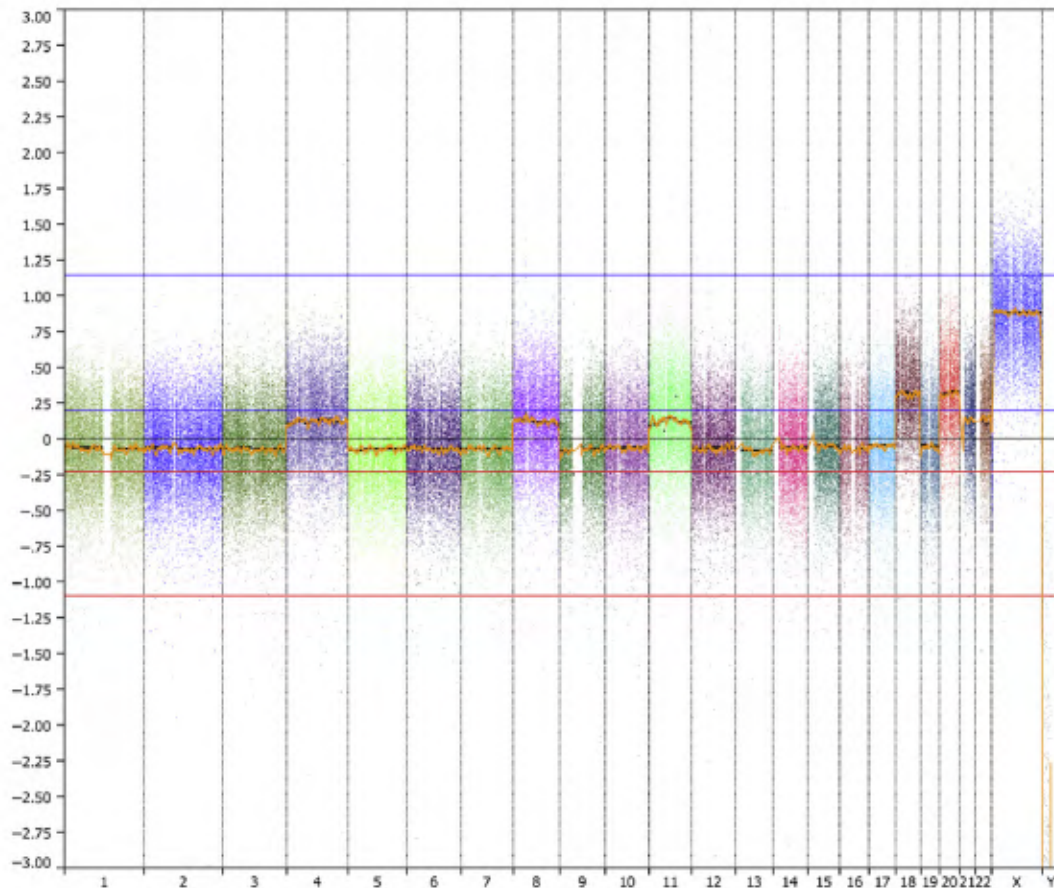


Figura 6: Análisis CGH en nódulo proliferativo que ocurre secundario a un nevus melanocítico en paciente de 3 años. Hay ganancias cromosómicas completas en cromosomas 4, 8, 11, 18, 20 y ganancias pequeñas en 21 y 22. Lang U, Yeh I, McCalmont T. *Molecular Melanoma Diagnosis Update Gene Fusion, Genomic Hybridization, and Massively Parallel Short-Read Sequencing. Clinics in Laboratory Medicine.* 2017;37(3):473-484.

TUMORES MELANOCÍTICOS SPITZOIDES

Los tumores de Spitz son un grupo heterogéneo de neoplasias melanocíticas que surgen en niños y adolescentes, pero también pueden ocurrir en individuos mayores. Los tumores de Spitz pueden ser solitarios o de distribución diseminada, tienen un diámetro de 10mm aproximadamente, son bien circunscritos y tienen forma de domo ¹⁷.

Los tumores de Spitz muestran aberraciones genéticas que son rara vez observados en las otras lesiones melanocíticas. La inactivación del BAP1 ocurre en el 5% de estos casos, y están asociados a un fenotipo epitelioides. Los tumores de Spitz con pérdida del BAP1 están asociados con un síndrome con predisposición a tumores hereditarios ¹⁷.

Mutación de HRAS ocurre en el 15% de las lesiones spitzoides, están asociados a menudo con desmoplasia y son comúnmente designados como nevus de Spitz desmoplásicos. Reordenamiento genómicos (traslocaciones, fusión quinasa) de varios receptores de tirosin quinasa, incluyendo ALK, ROS1, NTRK1, RET y MET están observados en el 50% de los tumores de Spitz.

Mutación del gen BAP1 se observó por primera vez en familias en el que varios miembros desarrollaron múltiples tumores melanocíticos epitelioides cutáneos en un patrón autosómico dominante, y menos común, melanomas cutáneos y de la úvea. Estos tumores melanocíticos epitelioides están localizados predominantemente en pieles con exposición al sol y el número de lesiones por individuo oscila entre unas pocas a más de 50. La vasta mayoría de los tumores de Spitz epitelioides familiares muestran una pérdida bi-alélica del BAP1. Un alelo BAP1 es inactivado a través de la línea BAP1, el otro alelo está inactivado somáticamente ya sea por una delección cromosómica del 3p21, disomía uniparenteral del cromosoma 3 con mutación del gen BAP1, o una inactivación adicional del BAP1 wild-type. La inactivación bialélica del gen BAP1 se correlaciona con la pérdida nuclear del BAP1 por inmunohistoquímica. Además, la vasta mayoría de las células epitelioides tienen mutación de BRAF^{V600E}.

Incremento en el número de copias de 11p (que contiene el locus HRAS) fue descrito en el 17% de los nevus de Spitz. La mayoría de los tumores con ganancias de 11p tienen activación de HRAS, mientras que es poco común en tumores sin la ganancia en 11p^{17,19}. Tumores con ganancia de 11p muestran una morfología característica de marcada desmoplasia y esclerosis estromal (figura 7). Estos tumores son predominantemente intradérmicos y con frecuencia tienen un patrón de crecimiento infiltrativo y bajo índice de proliferación¹⁷.

HRAS pertenece junto al KRAS y NRAS a la familia de los genes RAS. Mutación del HRAS se encuentran en menos del 1% de los melanomas, y no se conoce por qué ocurren casi exclusivamente en los nevus de Spitz. Una explicación es que HRAS activa la vía PI3K/AKT/mTOR más vigorosamente que las mutaciones de NRAS. La vía PI3K/AKT/mTOR se encarga de la regulación del tamaño y supervivencia de las células de los mamíferos. Esta

mutación explica porque los melanocitos de los nevos de Spitz son más grandes que las células névicas de los nevos adquiridos.

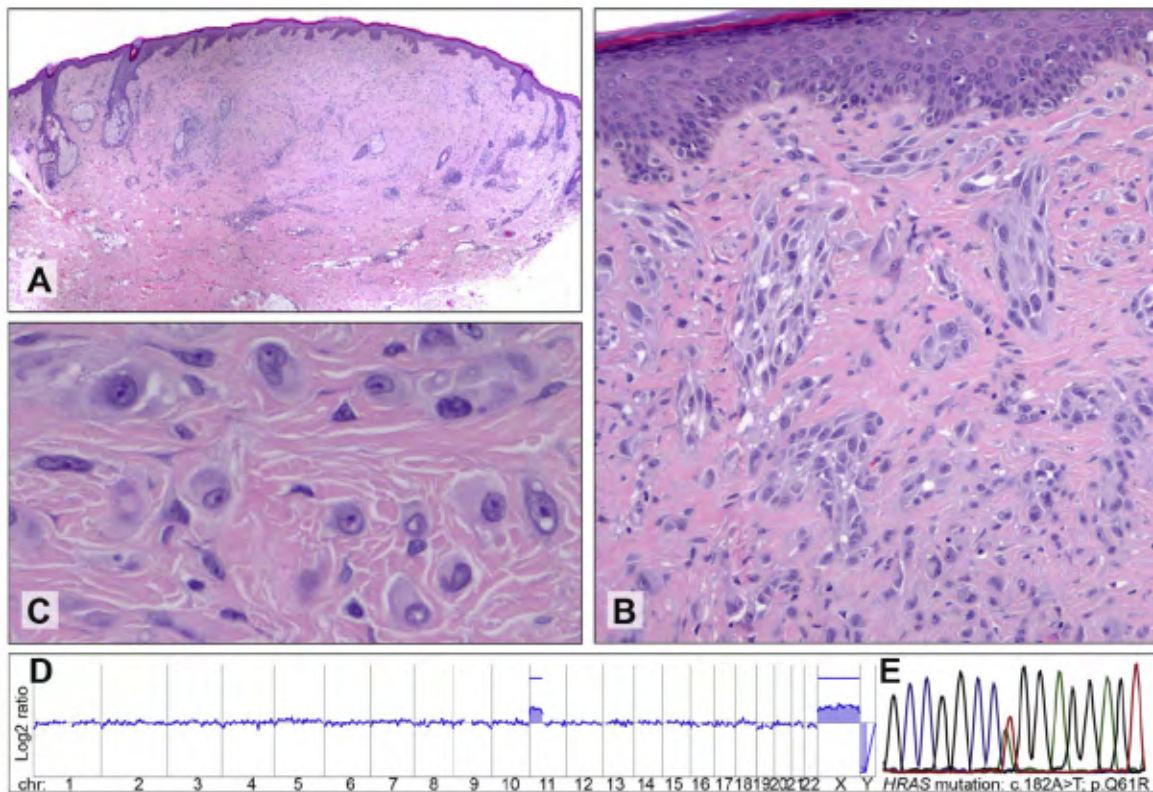


Figura 7: Tumor de Spitz desmoplásico que muestra mutación de HRAS y ganancia en el brazo corto del cromosoma 11. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm M, Busam K, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology*. 2016;48(2):113-131.

Reordenamientos de ALK ocurre hasta en el 10% de los tumores de Spitz y se han reportado en pacientes con edades entre 5 meses y 64 años. Tumores de Spitz ALK positivos son usualmente solitarios, con forma de domo y ocurren con más frecuencia en la extremidades. La mayoría de los tumores son amelanóticos. Histopatológicamente, la característica más importante es de melanocitos fusiformes en fascículos con intersecciones, o plexiforme sin marcado pleomorfismo^{17,21}.

La mayoría de las lesiones spitzoides fueron clasificados como tumores de Spitz atípicos (62%); solo el 8% fueron catalogados como melanomas spitzoides. Los tumores de Spitz ALK positivos analizados por FISH son negativos para cambios en el número de copias de 6p25,

6q23, cep6, cep9, 9p21 o 11q13, por lo que no cumplieron criterios por FISH para el diagnóstico de melanoma^{17,21}. En línea con estos resultados, CGH muestra con frecuencia un perfil balanceado sin aberraciones en el número de copias, o solo pocos cambios cromosómicos, incluyendo pérdida del cromosoma 2 (usualmente entre los locus ALK y DCTN1) o pérdidas en el cromosoma 1p^{17,21} (figura 8).

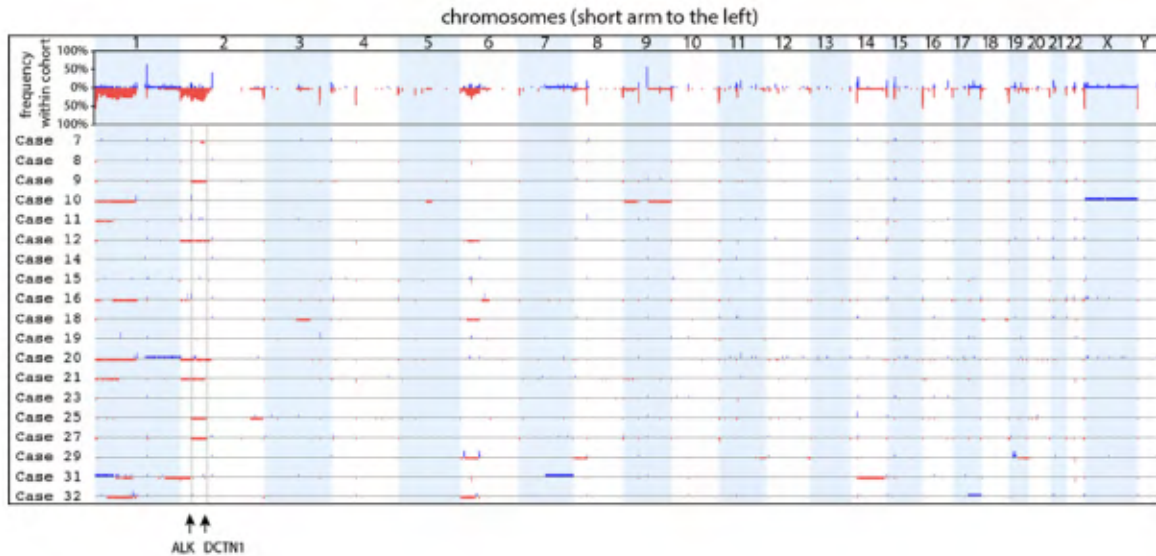


Figura 8: resultados CGH de tumores de Spitz ALK positivos. Los paneles superiores muestran la frecuencia del número de copias de cada posición genómica indicando pérdida recurrente de cromosomas 1p, 2p, 6p. Casos 9, 25 y 27 demuestran delección en la región 2p entre ALK y DCTN1 sugestivo de fusión DCTN1-ALK. Yeh I, de la Fouchardiere A, Pissaloux D, Mully T, Garrido M, Vemula S et al. *Clinical, Histopathologic, and Genomic Features of Spitz Tumors With ALK Fusions*. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2015;39(5):581-591.

Fusión del ROS1 se determinan hasta en el 10% de los tumores de Spitz, y ocurren en las extremidades de pacientes entre los 1 y 59 años. No hay citología ni histología característica en los tumores de Spitz con esta fusión¹⁷.

CGH COMO PREDICTOR DEL PRONÓSTICO DE LOS MELANOMAS

Namiki et al describió un intento de asociar los hallazgos en la CGH en los tumores primarios con la supervivencia de los pacientes. Encontraron que el número de aberraciones no parecía variar con el grosor del tumor, pero si que ganancias del 6p solo fueron vistos en los tumores

de mayor grosor. Pacientes con ganancias del 6p o 1p tienen un promedio menor de sobrevida (figura 9)²³.

Hirsch et al utilizó CGH para estudiar 20 melanomas con diferentes rangos de comportamiento clínico. Comparó 10 pacientes que murieron en una media de 3.7 años después del diagnóstico contra otros 10 pacientes que tuvieron una sobrevida libre de enfermedad media de 14.8 años; y encontró una asociación entre el grado de inestabilidad cromosómica con pobre sobrevida (figura 10). Mientras que melanomas con buen comportamiento mostraron solo unas pocas alteraciones cromosómicas (media de 1.6 por caso), melanomas con mal comportamiento tenían significativamente más aberraciones cromosómicas (media de 13.9 por caso)²⁴.

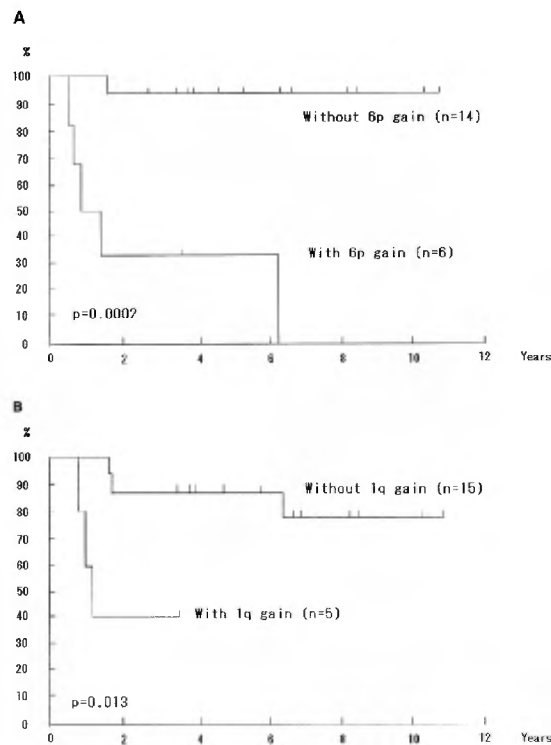


Figura 9: A: curvas de sobrevida de 6 pacientes con ganancia de 6p y 14 pacientes sin la ganancia de 6p. B: Curvas de sobrevida de 5 pacientes con ganancia 1q y 15 pacientes sin la ganancia de 1q. Namiki T, Yanagawa S, Izumo T, Ishikawa M, Tachibana M, Kawakami Y et al. *Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome. Cancer Genetics and Cytogenetics. 2005;157(1):1-11.*

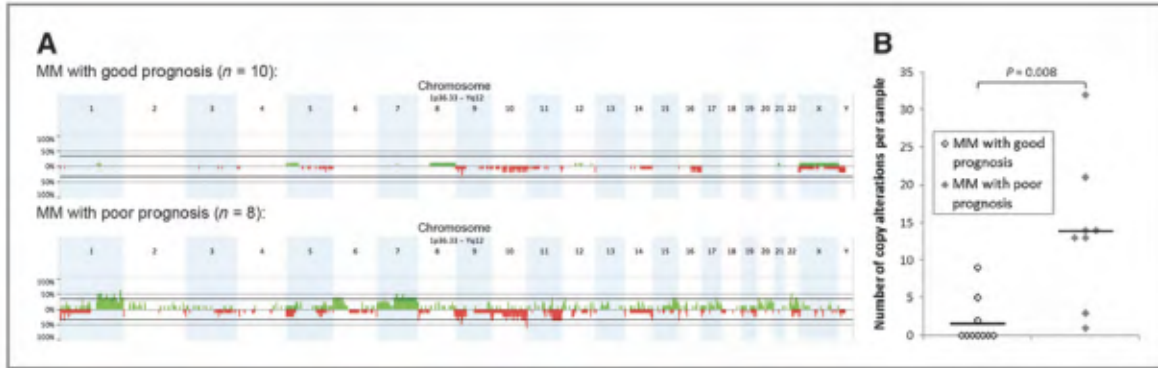


Figura 10: Aberraciones cromosómicas en melanomas con buen y pobre pronóstico A: frecuencia de número de ganancias (verde) y pérdidas (rojo) identificados en CGH en melanomas de buen y mal pronóstico. B: número de alteraciones de copias en cada muestra como función de pronóstico. Hirsch D, Kemmerling R, Davis S, Camps J, Meltzer P, Ried T et al. Chromothripsis and Focal Copy Number Alterations Determine Poor Outcome in Malignant Melanoma. Cancer Research. 2012;73(5):1454-1460.

CONCLUSIONES

En resumen, los estudios de CGH muestran que los melanomas tienen un patrón recurrente de aberraciones cromosómicas que es distinto a los nevus melanocíticos y debe de ser considerado como futura prueba diagnóstica en las lesiones ambiguas, además como predictor pronóstico de la enfermedad.

Como toda prueba tienen sus desventajas, siendo quizás la mayor el costo del estudio y el requerimiento de tejido para poder efectuar la prueba, esto si se compara con pruebas de FISH, ya que una prueba de CGH requiere por lo general 20 cortes a 5 micras de grosor, a diferencia de los 4 cortes utilizados en las pruebas de FISH ²⁵.

Los resultados que puedan brindar la CGH tienen una alta sensibilidad y especificidad (80-90% tanto en sensibilidad como especificidad), que cuando se combina con los datos clínicos y características histológicas, se puede dar el diagnóstico con más certeza de los tumores melanocíticos cutáneos, que para la práctica diaria de los patólogos y para tranquilidad de los pacientes y los médicos tratantes, esta herramienta es de gran provecho, sobre todo para evitar errores diagnósticos de melanomas que realmente son nevus banales, o peor aún, diagnósticos de nevus que realmente son melanomas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cockerell C. The Pathology of Melanoma. *Dermatologic Clinics*. 2012;30(3):445-468.
2. Calonje E, McKee P. *McKee's pathology of the skin*. Edinburgh: Elsevier, Saunders; 2012.
3. Scolyer R, Prieto V. Melanoma Pathology: Important Issues for Clinicians Involved in the Multidisciplinary Care of Melanoma Patients. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2011;20(1):19-37.
4. Weiss S, Han S, Lui K, Tchack J, Shapiro R, Berman R et al. Immunologic heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocyte composition in primary melanoma. *Human Pathology*. 2016;57:116-125.
5. Simonson WALLison K. Tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: implications for the diagnostic pathologist. *Diagnostic Histopathology*. 2011;17(2):80-90.
6. Rebecca V, Sondak V, Smalley K. A brief history of melanoma. *Melanoma Research*. 2012;22(2):114-122.
7. Gallegos Hernández J. Melanoma. Fundamentos del diagnóstico y la terapéutica. *Acta médica grupo ángeles*. 2012;10(4):207-213.
8. Sasaki K, Kawauchi S. Molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Journal of Orthopaedic Science*. 2003;8(3):457-459.
9. Bernheim A. Cytogenomics of cancers: From chromosome to sequence. *Molecular Oncology*. 2010;4(4):309-322.
10. Patterson J, Hosler G. *Weedon's skin pathology*. [Philadelphia]: Churchill Livingstone/Elsevier; 2016.
11. Busam K. Molecular pathology of melanocytic tumors. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2013;30(4):362-374.
12. Lang U, Yeh I, McCalmont T. Molecular Melanoma Diagnosis Update Gene Fusion, Genomic Hybridization, and Massively Parallel Short-Read Sequencing. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2017;37(3):473-484.
13. Nagarajan P, Tetzlaff M, Curry J, Prieto V. Use of New Techniques in Addition to IHC Applied to the Diagnosis of Melanocytic Lesions, With Emphasis on CGH,

- FISH, and Mass Spectrometry. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*. 2017;108(1):17-30.
14. Bastian B, Olshen A, LeBoit P, Pinkel D. Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number Changes. *The American Journal of Pathology*. 2003;163(5):1765-1770.
 15. March J, Hand M, Grossman D. Practical application of new technologies for melanoma diagnosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2015;72(6):929-941.
 16. Curtin J, Fridlyand J, Kageshita T, Patel H, Busam K, Kutzner H et al. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(20):2135-2147.
 17. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm M, Busam K, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology*. 2016;48(2):113-131.
 18. Bastian B, Xiong J, Frieden I, Williams M, Chou P, Busam K et al. Genetic Changes in Neoplasms Arising in Congenital Melanocytic Nevi. *The American Journal of Pathology*. 2002;161(4):1163-1169.
 19. Bastian B, Wessellmann U, Pinkel D, LeBoit P. Molecular Cytogenetic Analysis of Spitz Nevi Shows Clear Differences to Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113(6):1065-1069.
 20. Murphy M, Jen M, Chang M, Grant-Kels J, Makkar H. Molecular diagnosis of a benign proliferative nodule developing in a congenital melanocytic nevus in a 3-month-old infant. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008;59(3):518-523.
 21. Tetzlaff M, Reuben A, Billings S, Prieto V, Curry J. Toward a Molecular-Genetic Classification of Spitzoid Neoplasms. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2017;37(3):431-448.
 22. Yeh I, de la Fouchardiere A, Pissaloux D, Mully T, Garrido M, Vemula S et al. Clinical, Histopathologic, and Genomic Features of Spitz Tumors With ALK Fusions. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2015;39(5):581-591.

23. Namiki T, Yanagawa S, Izumo T, Ishikawa M, Tachibana M, Kawakami Y et al. Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005;157(1):1-11.
24. Hirsch D, Kemmerling R, Davis S, Camps J, Meltzer P, Ried T et al. Chromothripsis and Focal Copy Number Alterations Determine Poor Outcome in Malignant Melanoma. *Cancer Research*. 2012;73(5):1454-1460.
25. Ankeny J, Labadie B, Luke J, Hsueh E, Messina J, Zager J. Review of diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in melanoma. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2018;.
26. Bauer J. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Era of Cytogenetics and Copy Number Analysis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017;137(5):e57-e59.