

CAPÍTULO

4.9

Melanoma uveal. Bases moleculares y citogenética

Raquel Ramos Martín, Mar Varela Rodríguez

INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos esfuerzos para descifrar las bases moleculares implicadas en el melanoma uveal (MU) y su progresión metastásica. A pesar de que factores clínicos como el tamaño tumoral y su localización, o características histopatológicas como el tipo celular y su actividad mitótica se han asociado a un mayor riesgo de metástasis, los análisis del perfil molecular y citogenético del tumor primario confieren una mayor precisión a la hora de pronosticar el riesgo de diseminación metastásica. Conocer el perfil molecular del MU favorece un mejor manejo del paciente, permite identificar las vías de señalización alteradas, y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico de los pacientes con enfermedad metastásica.

Alteraciones genéticas del melanoma uveal

A diferencia del melanoma cutáneo, el MU se caracteriza por una baja incidencia mutacional (14,4 mutaciones/Mb versus 1,3 mutaciones/Mb, respectivamente)(1). El inicio de la transformación maligna de los melanocitos que residen en el tracto uveal está asociada a la activación de la señalización *downstream* de los receptores ligados a proteínas G (GPCR). Más del 90% de los MUs presenta una mutación de forma mutuamente excluyente en los genes *GNAQ* o *GNA11* principalmente afectando al codón G209, menos frecuentemente al codón R183, y excepcionalmente al codón G48 (2). Los genes *GNAQ* y *GNA11* codifican para la subunidad *alpha* de las proteínas G ($G\alpha$) unidas al receptor GPCR. En condiciones normales el receptor GPCR

es inactivado por la GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, pero estas mutaciones inhiben la actividad GTPasa dando lugar a la activación constitutiva del receptor. En los casos en los que *GNAQ* o *GNA11* no están mutados, se han observado alteraciones en *CYSLTR2* (4%) o en *PLCB4* (2,5%)(3). *CYSLTR2* es un receptor GPCR, cuando su codón L129 se ve afectado por una mutación puntual, el receptor pasa a estar permanentemente activado (4). Algo similar sucede con el gen *PLCB4*, que codifica para una proteína *downstream* del receptor GPCR. Mutaciones que afecten el codón D630 derivan en la activación de vías de señalización *downstream* de este receptor (3). Las variaciones en *GNAQ* y *GNA11* también se han observado en nevus uveales, indicando que son necesarias para el desarrollo del MU, pero no suficientes para dar lugar a una transformación maligna (5).

Mutaciones secundarias que sí derivan en la formación del tumor maligno y en mayor o menor medida en su diseminación metastásica, afectan a los genes *BAP1*, *SF3B1* y *EIF1AX* (6). *BAP1* está localizado en el cromosoma 3q21.3, y codifica para una proteína con función supresora tumoral que se localiza en el núcleo. En línea con el modelo *Two-Hit* de tumorigénesis de Knudson, *BAP1* está mutado en el alelo que persiste en aquellos tumores que presentan monosomía del cromosoma 3, derivando en ausencia completa de proteína funcional e incrementando el riesgo metastásico (7). De hecho, más del 80% de las metástasis del MU retienen únicamente el alelo mutado (3).

Las metástasis del MU que no presentan mutaciones en *BAP1*, habitualmente presentan una mutación en *SF3B1* o en su defecto en el gen *EIF1AX*, aunque recientemente se ha reportado concurrencia de mutaciones en *BAP1* y *SF3B1* (8). Mutacio-

nes en *SF3B1* resultan en un *splicing* aberrante durante el proceso de traducción, dando lugar a proteínas defectuosas o a la degradación del RNA resultante (9). *SF3B1* está asociado a disomía del cromosoma 3, y al contrario de lo que sucede en los tumores deficientes de BAP1 los cuales están asociados a la detección temprana de metástasis (5 años de media)(7), en el caso de tumores con *SF3B1* mutado el riesgo de metástasis es intermedio, y su manifestación clínica más tardía (8 años de media)(10). Mutaciones en *EIF1AX* alteran la expresión génica, ya que *EIF1AX* está involucrado en el reconocimiento del codón de inicio durante el proceso de traducción. Pese a ello, los MUs con *EIF1AX* mutado raramente metastatizan (11).

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS QUE CONTRIBUYEN AL DESARROLLO DEL MELANOMA UVEAL

La metilación del DNA es un evento epigenético que puede dar lugar al silenciamiento de genes supresores de tumores o a la activación de oncogenes. En el MU la hipermetilación del promotor del supresor tumoral *RASSF1A* da lugar a una desregulación del ciclo celular (12,13) favoreciendo la progresión neoplásica. Así mismo, la metilación del promotor de *RASEF* se ha asociado a la disminución de la supervivencia en pacientes con MU (14), y el silenciamiento epigenético de *PTEN* a la activación de señales antiapoptóticas y de proliferación celular vía *AKT* (15). La metilación del promotor de *TRAIL*, *p16INK4a* o *RAB31* entre otros, son a su vez alteraciones frecuentemente descritas en el MU (16,17).

La evolución oncogénica del MU también puede estar asociada a la metilación de histonas. Por ejemplo, la modificación de la histona H3 mediante la trimetilación de su lisina 4 (H3K4m3) tiene como consecuencia un aumento de la expresión de *HES1*, un factor de transcripción asociado a incremento del riesgo metastático en el MU (18).

Los microRNAs (miRs) también actúan como modificadores epigenéticos, y están involucrados en la señalización oncogénica en el MU. Los miRs son RNAs no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. De entre los miRs cuya expresión diferencial ha sido asociada al MU, se ha detectado un aumento en la expresi-

ón de miR-20a, -125b, -146a, -155 y -223, implicados en la desregulación de la respuesta inmune durante el proceso metastático (19). Otro ejemplo es miR-124a, que actúa como supresor tumoral inhibiendo el crecimiento, la migración y la invasión celular, y que está silenciado epigenéticamente en el MU (20). Incremento en la expresión de let-7b, miR-199, -143, -193 y -652, se ha asociado a tumores con monosomía del cromosoma 3 y alto riesgo metastático (21), poniendo de manifiesto que el análisis de la expresión diferencial de miRs puede ser una herramienta útil en la predicción del riesgo metastático en el MU.

Vías de señalización implicadas en la progresión y metástasis del melanoma uveal

La progresión del tumor primario requiere de la activación de señales de supervivencia, crecimiento celular y proliferación. En la mayoría de los MUs, la proteína del RB (retinoblastoma) es funcionalmente inactiva, debido a la sobreexpresión de la proteína Ciclina D1 (65% de los casos), o debido a la hipermetilación del promotor *CDKN2A* (32% de los casos), dando lugar a pérdida de la inhibición del ciclo celular y permitiendo la proliferación celular descontrolada (22,23).

En el MU, la activación de las vías de MAPK y PI3K/AKT promueven la proliferación autónoma de las células tumorales. La activación de la vía de RAF/MEK/ERK (MAPK) es debida a las mutaciones en *GNAQ* y *GNA11*, aunque en su activación constitutiva están implicados otros factores (24). La activación de la vía de PI3K/AKT se asocia a la sobreexpresión de receptores tirosina quinasa (RTK) característica de los MUs. c-Met está expresado en el 98% de los tumores primarios (25), IGF-1R en más del 90% (26), y c-Kit en el 75% (27). Además de promover la proliferación celular, la desregulación de la vía de PI3K/AKT debido a la pérdida de función de su inhibidor *PTEN*, resulta en la inhibición de la apoptosis celular favoreciendo la progresión del MU (28) (fig. 1). Por otro lado, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) está presente en el 94% de los tumores primarios y el 37% de las metástasis (29), viéndose favorecida la progresión tumoral y metastática mediante la angiogénesis sostenida.

En el MU las capacidades migratorias e invasivas de las células metastáticas están mediadas por

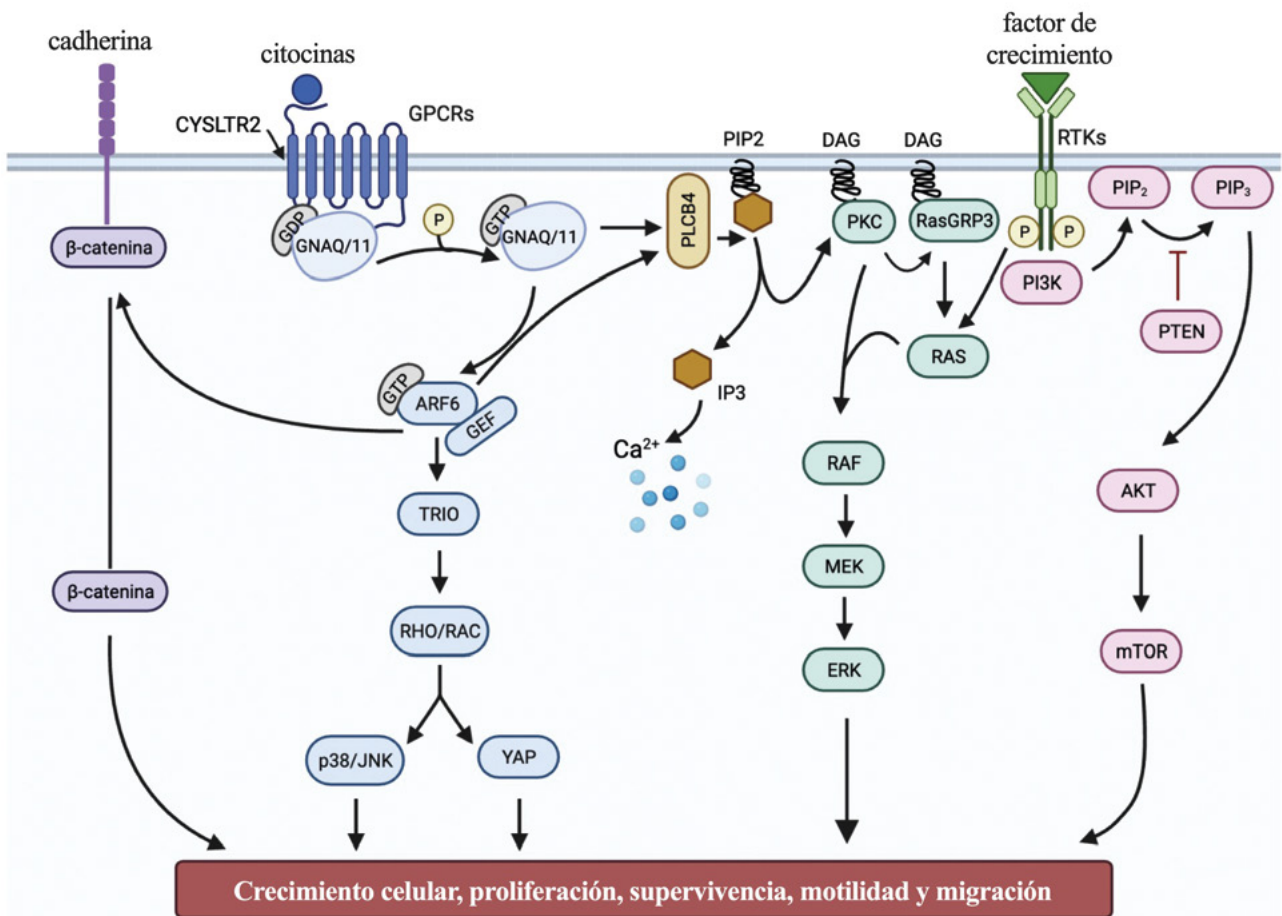


Fig. 1: Vías de señalización y factores involucrados en la oncogénesis del melanoma uveal. Las mutaciones en *GNAQ/11* activan la vía de señalización de MAPK (en verde), JNK/YAP (en azul), beta-catenina a través de ARF6 (en lila), y la señalización dependiente de calcio a través de PLCB4. Los receptores tirosina quinasa (RTKs) estimulan la vía de MAPK y AKT (en rojo).

la adquisición de la EMT (pseudo-transición epitelio mesénquima), la activación de las vías de KRAS, beta-catenina, y la sobreexpresión de MMPs (metaloproteinasas de matriz extracelular)(30-32). Las células tumorales circulantes utilizan la señalización mediada por citocinas para anidar de forma específica en órganos secundarios (33). El MU muestra un patrón de metástasis órgano-específico, diseminando hacia el hígado en más del 90% de los casos (34). En el caso del MU, la expresión de los receptores IGF-1R, c-Met o CXCR4, favorecería la migración de las células tumorales hacia el hígado, el cual expresa elevados niveles de sus respectivos ligandos IGF-1, HGF y CXCL12 (35,36). La subsecuente activación de las vías de señalización MAPK y AKT promovería la supervivencia y proliferación celular (36), requisitos indispensables para que se lleve a cabo la colonización del órgano secundario.

ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL PRONÓSTICO DE RIESGO METASTÁSICO

Existen diferentes herramientas que ayudan a predecir el riesgo de metástasis en el MU. La clasificación del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) se basa en datos genéticos, epigenéticos y citogenéticos para dividir los tumores primarios del MU en cuatro subgrupos de riesgo (37). Los grupos A y B (también conocidos como clase 1A y clase 1B), están asociados a un riesgo bajo (A) o intermedio (B) de desarrollar metástasis, con mayor supervivencia de los pacientes. Los tumores del tipo A y B se caracterizan por disomía del cromosoma 3 y ganancia del cromosoma 6p, y difieren en que los tumores de tipo A presentan *EIF1AX* mutado, mientras que los del tipo B presentan ganancia parcial del cromosoma 8q y *SF3B1* mutado (3,37). Los tipos C y D (también conocidos como clase 2A y clase 2B) se

asocian a alto riesgo metastásico. En ambos casos los tumores se caracterizan por monosomía del cromosoma 3, pérdida de expresión de *BAP1*, y ganancia del cromosoma 8q. La diferencia entre ambos grupos reside en que el número de copias del cromosoma 8q es mayor en el tipo D, y adicionalmente existe pérdida del cromosoma 6q (38) (fig. 2).

Además de las alteraciones génicas y cromosómicas típicas del MU, PRAME se ha identificado como un marcador independiente de pronóstico en la diseminación metastásica (39). De entre los tumores de menor riesgo metastásico, la expresión de PRAME se ha asociado a los del tipo B, mientras que entre los que mayor riesgo metastásico su expresión se ha asociado a los del tipo D.

TÉCNICAS MOLECULARES DE Rutina CON APLICACIÓN EN EL MELANOMA UVEAL

En el MU existen una serie de indicadores de pronóstico de carácter molecular que permiten estratificar a los pacientes en grupos de riesgo metastásico y, por lo tanto, realizar un seguimiento

estratégico de aquellos con pronóstico desfavorable. Debido a ello surgió la necesidad de utilizar métodos de rutina en los laboratorios de Patología Molecular, que ofrecieran información sobre dichos indicadores.

A continuación, se comentarán las principales técnicas que están implantadas en los departamentos de Anatomía Patológica y que pueden tener aplicación en el análisis molecular de muestras de MU.

Técnicas de rutina para la detección de alteraciones citogenéticas en MU

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La hibridación in situ fluorescente (FISH) utiliza sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos que hibridan sobre secuencias diana y por lo tanto permite detectar cambios cromosómicos numéricos (aneuploidías) o estructurales (translocaciones e inversiones). Sus principales ventajas están relacionadas con su aplicación sobre núcleos en interfase, y además, está ampliamente implementada

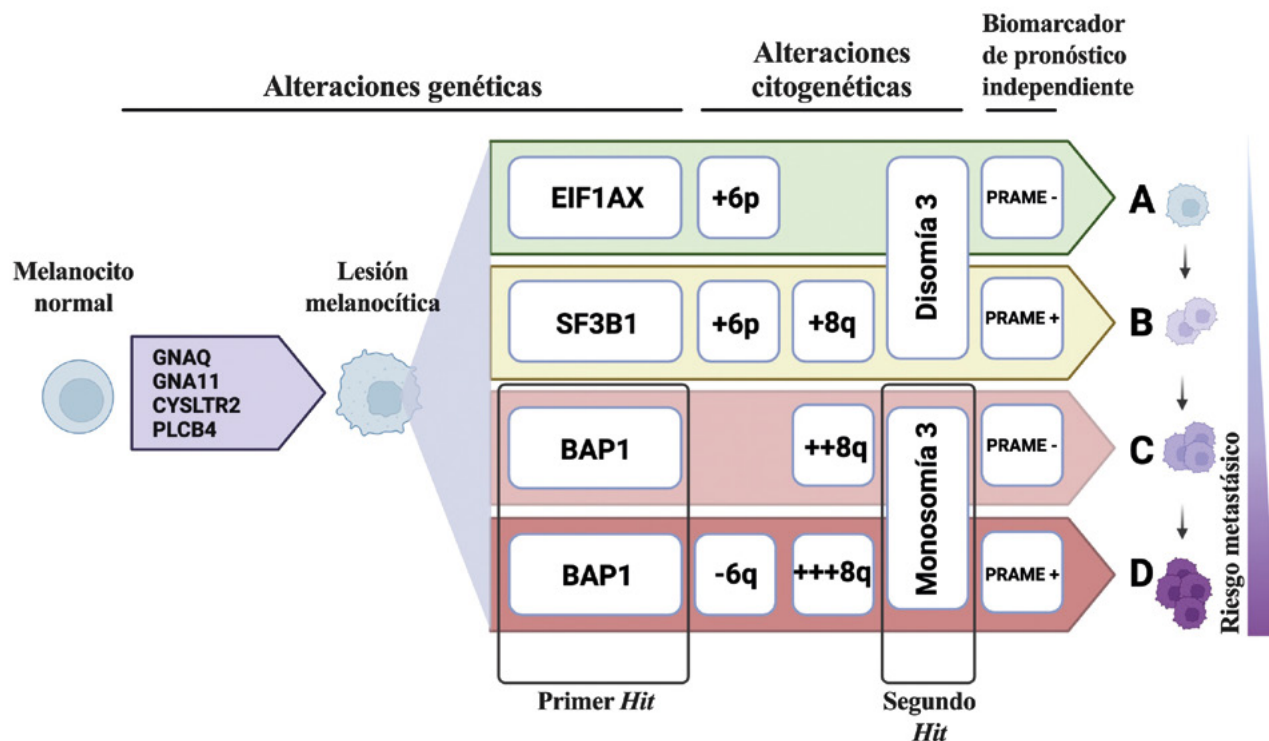


Fig. 2: La adquisición secuencial de alteraciones genéticas y citogenéticas en el melanoma uveal define el riesgo de metástasis. Mutaciones iniciales en *GNAQ/11*, *CYSLTR2* o *PLCB4* se acompañan de mutaciones y alteraciones cromosómicas secundarias estratificando los melanomas uveales en cuatro grupos según su riesgo metastásico, siendo el riesgo en A bajo, B intermedio y C/D alto.

da en la mayoría de los laboratorios de Patología Molecular, permitiendo el uso de material de archivo fijado en formol e incluido en parafina (fig. 3).

La monosomía del cromosoma 3 se puede identificar mediante el uso de una sola sonda centromérica, pero esta estrategia puede no ser eficaz para la detección de deleciones parciales, es decir aquellas que afectan solo a regiones pequeñas localizadas en alguno de los dos brazos cromosómicos (3p o 3q) (40). Una de las posibles soluciones a este problema es optar por utilizar más de una sonda que hibride en cada uno de los brazos cromosómicos. Recientemente se ha publicado acerca de la importancia de las deleciones parciales de la región del cromosoma 3 que contiene al gen *BAP1* (3p21.31-p21.2) y cómo estos pacientes pueden tener una supervivencia reducida frente a los pacientes con monosomía 3 sin alteraciones de *BAP1* (41).

Al utilizar esta técnica también se debe tener en cuenta que existe una variabilidad significativa entre grupos de diferentes centros, debida a la subjetividad en el análisis de los resultados por parte del observador, y a la ausencia de una guía consenso sobre el número de núcleos a contar ni en el establecimiento de un punto de corte a partir del cual se considere que la muestra presenta una alteración determinada. A todo esto, hay que añadir el hecho de que es complicado abordar el análisis de aneuploidías en varios cromosomas simultáneamente.

Análisis de microsatélites

El análisis de microsatélites (MSA) se ha utilizado a menudo para determinar la monosomía del cromosoma 3 con fines pronósticos. Los microsatélites corresponden a un tipo particular de polimorfismo del ADN: son secuencias repetitivas, repartidas a

lo largo del genoma y de tamaño distinto entre diferentes individuos. Esto se traduce en un elevado grado de heterocigosidad en la población general y provoca que cada individuo presente dos alelos de distinto tamaño en la mayoría de los marcadores analizados.

El estudio citogenético se lleva a cabo mediante la utilización de cebadores de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) marcados con fluorescencia, que amplifican una serie de marcadores repartidos a lo largo del cromosoma que se quiere analizar. Una vez amplificados, se realiza un análisis del tamaño de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis capilar. Este estudio se realiza en paralelo en la muestra tumoral y en la muestra de tejido normal del mismo individuo (habitualmente sangre periférica) y, de esta manera, se puede detectar la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el tumor al perder uno de los dos alelos presentes en el tejido normal (fig. 4).

Entre las ventajas del MSA está la posibilidad de detectar la homocigosidad adquirida (isodisomía) del cromosoma 3 (43), que está presente en un 5-10% de los casos. En estos se produce la pérdida de una copia del cromosoma 3 y se duplica la copia restante, siendo funcionalmente equivalente a una monosomía y que no es detectable por técnicas como la FISH. Además, este análisis nos permite detectar deleciones parciales si tenemos la región de estudio bien cubierta por microsatélites.

Por otra parte, entre los inconvenientes que presenta esta técnica podemos destacar que la detección de monosomía puede verse afectada por la heterogeneidad tumoral, que no resulta adecuada para estudiar ganancias cromosómicas y solo permite analizar un número limitado de marcadores simultáneamente.

Amplificación de sondas multiplex dependiente de ligación (MLPA)

En 2002 MRC Holland desarrolló la técnica del MLPA (*Multiple ligation probe amplification*) como un método de detección de variaciones en el número de copias tanto de cromosomas completos como de exones individuales (44). El MLPA es una técnica de PCR multiplex simple que utiliza un solo par de cebadores para amplificar hasta 60 sondas, cada una con una longitud y una diana única.

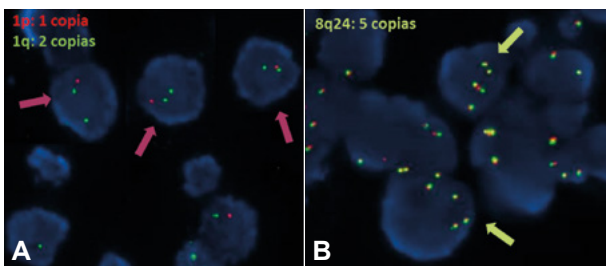


Fig. 3: Hibridación in situ fluorescente (FISH). **A.** Núcleos que muestran pérdida de la región del cromosoma 1p (flechas). **B.** Núcleos que muestran ganancia del gen *MYC*, localizado en la región cromosómica 8q24 (flechas).

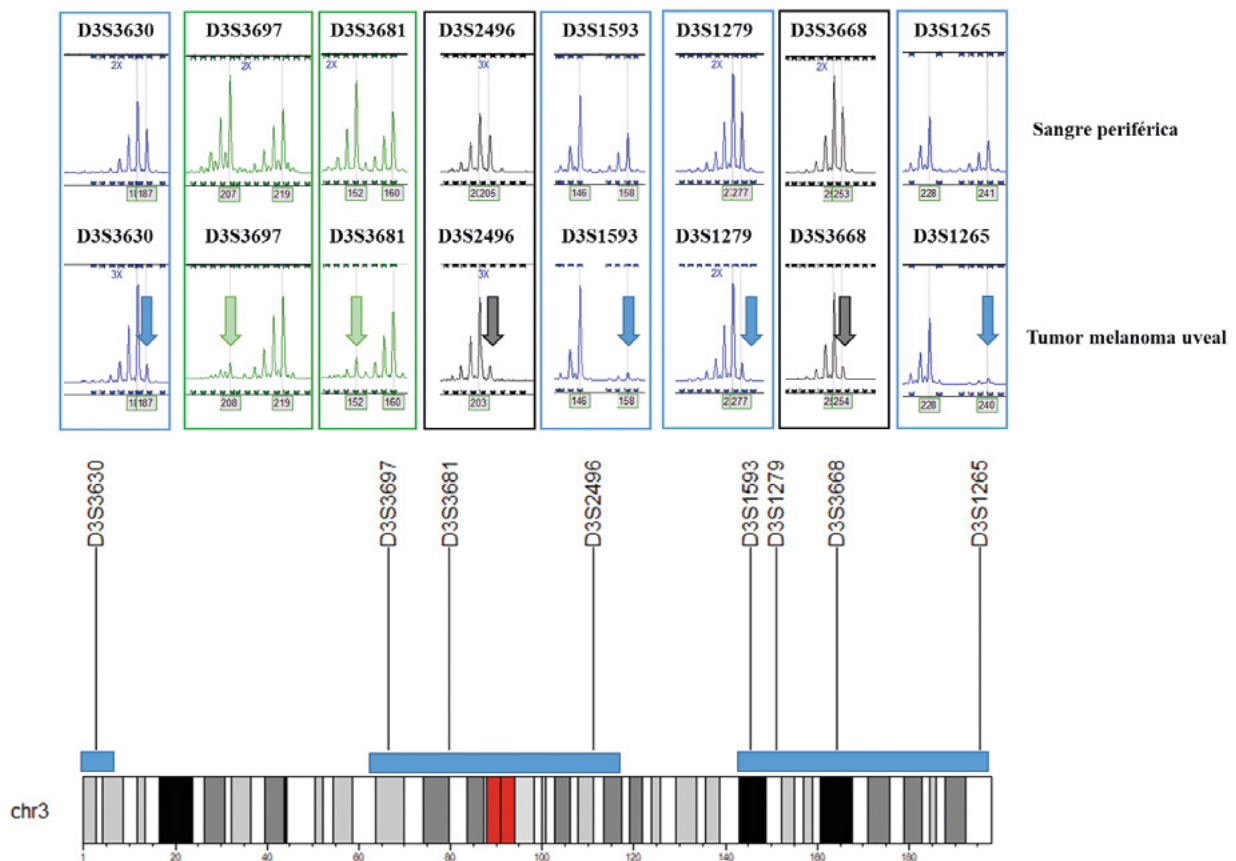


Fig. 4: Caso de MU que muestra pérdida del cromosoma 3 utilizando en el análisis 8 microsatélites informativos. Se muestra pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 3 entero, al comparar para cada marcador la pérdida alélica en las células del tumor indicado mediante flechas con una muestra de sangre periférica del mismo individuo. Los marcadores utilizados fueron seleccionados del panel ABI PRISM® Linkage Mapping Set (Applied Biosystems), visualización de los alelos mediante el programa GeneMarker v3.01 (SoftGenetics). El idiograma cromosómico con los marcadores analizados se obtuvo mediante karyoploteR (42), se indica mediante rectángulo azul las zonas delecionadas.

Los amplicones de PCR se marcan con fluorescencia y se separan y cuantifican mediante electroforesis capilar. En este caso se necesita comparar el patrón de picos resultante de la muestra tumoral con un grupo de muestras de referencia que se analizan conjuntamente. Existe un ensayo comercial específico para MU (SALSA MLPA Probemix P027 Uveal melanoma, ©MRC Holland) (fig. 5) que permite detectar, en un sólo análisis, alteraciones en el número de copias de los cromosomas 1, 3, 6 y 8 (45). Esta técnica posee algunas ventajas frente a otras que permiten analizar simultáneamente varias regiones cromosómicas, como los arrays-CGH, ya que se trata de una técnica sencilla, rápida y de bajo coste, y que requiere una menor cantidad de ADN, siendo especialmente útil en muestras pequeñas. Además, utiliza equipos que son accesibles para la mayoría de los laboratorios de Patología Molecular.

Como inconveniente principal cabe destacar que los resultados obtenidos pueden verse afectados por cambios en la secuencia específica de ADN donde se une la sonda del MLPA, provocados por la presencia de una mutación o de una variante polimórfica.

Técnicas de rutina para la detección de mutaciones en genes implicados en el desarrollo del melanoma uveal

Como se ha comentado anteriormente, la detección de mutaciones en los genes *EIF1AX* (presente en aproximadamente el 15% de los casos de MU), *SF3B1* (25%) y *BAP1* (50%) tiene implicación pronóstica y determina tres categorías de riesgo de desarrollar enfermedad metastásica (riesgo bajo, medio y alto, respectivamente).

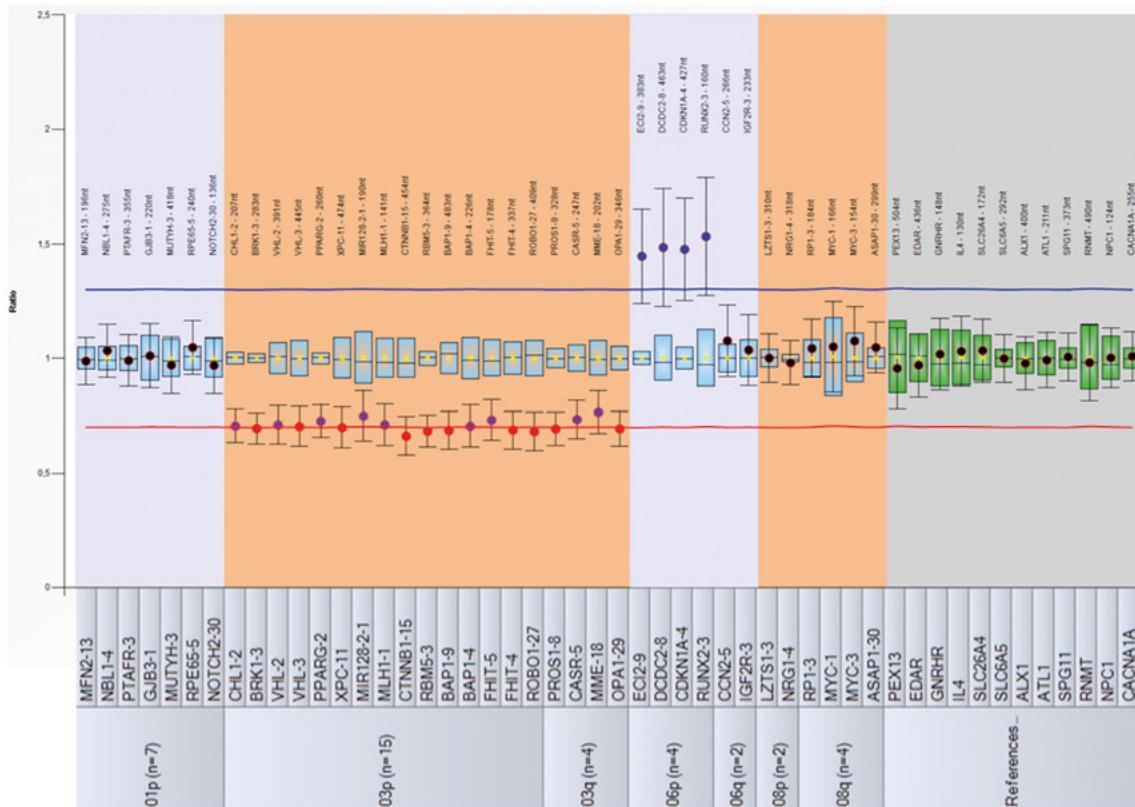


Fig. 5: Amplificación de sondas multiplex dependiente de ligación (MLPA). Análisis mediante el software Coffalyser[®] (MRC Holland), mostrando la pérdida completa del cromosoma 3 y la ganancia del brazo corto del cromosoma 6 (+6p).

Por otra parte, existen una serie de mutaciones activadoras de los genes de la vía de señalización de los receptores acoplados a proteínas $G\alpha q$ (GPCR), cuya presencia no ha sido relacionada con el pronóstico. El 92% de los casos de MU, presentan mutaciones en *GNAQ* o *GNA11* (de manera excluyente) y el 2% y 4% mutaciones en los genes *PLCB4* y *CYSLTR2*. En este caso, la detección de estas mutaciones ayuda a caracterizar el tumor y es útil para validar los resultados de las pruebas moleculares, especialmente en muestras donde se obtiene muy poco material y falta la correlación histopatológica (como en las muestras que provienen de punciones de aguja previas a la braquiterapia) (fig. 6).

Secuenciación de primera generación

La técnica de secuenciación de primera generación, o secuenciación Sanger (46) ha sido aplicada con éxito en la detección de mutaciones en los genes de interés implicados en el MU. En la actualidad, dicha técnica se basa en la amplificación del ADN

mediante PCR y en la utilización de dideoxinucleótidos (ddNTPs) fluorescentes terminadores que se analizan en un secuenciador mediante electroforesis capilar. Como resultado se obtiene un cromatograma o electroferograma de la secuencia estudiada.

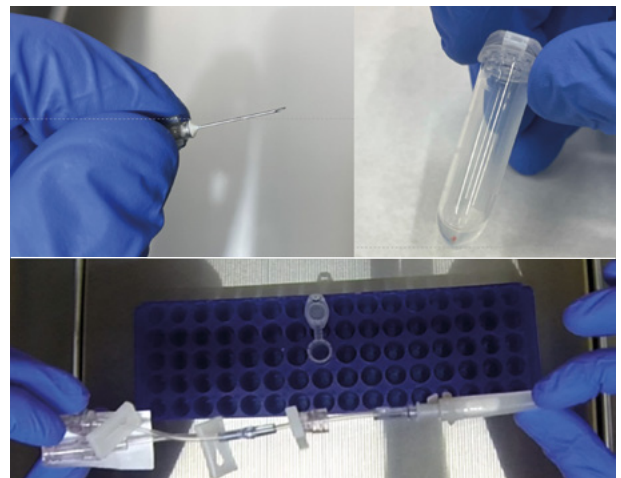


Fig. 6: Dispositivo para obtener muestra para estudio molecular de MU (citogenética y mutaciones) mediante punción de aguja.

Existen otras variantes más recientes, como la pirosecuenciación, que se basa en el principio de secuenciación por síntesis y proporciona resultados cuantitativos. En este caso la incorporación de los nucleótidos está acompañada por la liberación de grupos pirofosfato (PPi), en presencia de ATP sulfurilasa y luciferasa generando una señal luminosa que es proporcional al número de nucleótidos incorporados y que se visualiza como un pico en el pirograma (fig. 7). Esta técnica resulta práctica, rápida y de costos reducidos para estudiar genes en los que se producen mutaciones puntuales (que afectan a un nucleótido) y que se concentran en unos pocos codones (*hotspots*).

Entre los inconvenientes de la secuenciación de primera generación destacan: la calidad del DNA obtenido a partir de material de archivo fijado en formol e incluido en parafina, que el estudio se debe realizar de manera secuencial (o sea que el análisis de cada gen se debe abordar de manera individual), y que la secuenciación de *hotspots* puede obviar mutaciones poco frecuentes que afectan a otras regiones del mismo gen.

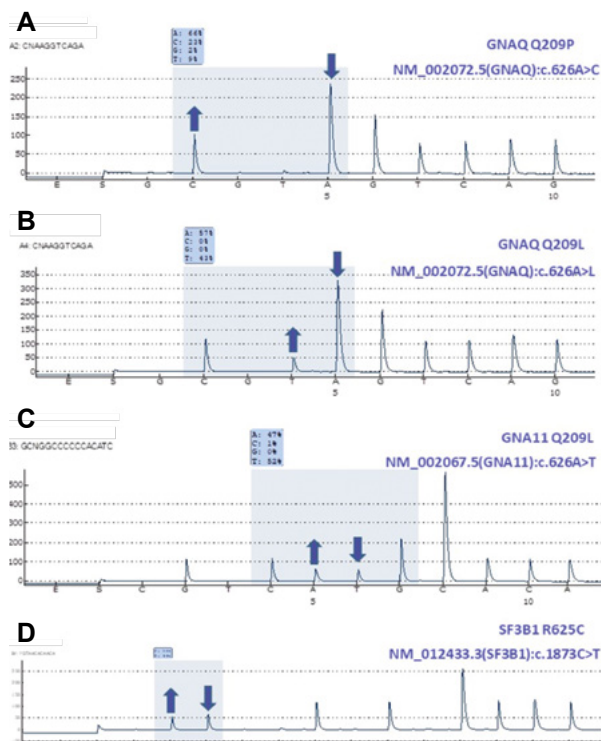


Fig. 7: Pirogramas característicos de muestras de MU con mutaciones en *GNAQ* (A y B), en *GNA11* (C) y en *SF3B1* (D). Los cambios en la secuencia se indican con flechas azules, hacia abajo reducción del nucleótido de la secuencia normal y hacia arriba el aumento del nucleótido de la secuencia mutada.

Como podemos ver en las figuras 8 y 9 los genes *GNAQ*, *GNA11*, *SF3B1* y *EIF1AX*, presentan unos pocos *hotspots* mutacionales, mientras que en el caso del gen *BAP1*, las mutaciones se encuentran repartidas a lo largo de toda la secuencia del gen.

En resumen, la necesidad de analizar la secuencia de varios genes (a nivel de *hotspot* o de secuencia completa) para caracterizar el tumor y establecer el pronóstico del paciente puede resultar laborioso y poco costo-eficaz utilizando técnicas de secuenciación de primera generación.

Secuenciación de nueva generación (NGS)

El desarrollo de las plataformas de secuenciación denominadas de alto rendimiento o de nueva generación (*Next-Generation Sequencing* o NGS) han permitido la secuenciación de forma masiva y en paralelo de millones de fragmentos de ADN en un único proceso. Frente a los sistemas clásicos de secuenciación, la NGS ofrece un mayor rendimiento y sensibilidad. Existen varias plataformas de secuenciación que se diferencian entre ellas por la técnica empleada para la preparación de las librerías y en la química utilizada para la propia secuenciación (47).

Las dos plataformas de secuenciación masiva que han tenido más éxito en su distribución en el ámbito hospitalario de diagnóstico molecular, han sido comercializadas por las compañías de ThermoFisher e Illumina. En concreto las plataformas tipo Ion Torrent™ (ThermoFisher) funcionan con secuenciadores que utilizan chips semiconductores. Durante la síntesis de la secuencia de ADN, cada vez que se incorpora un nuevo nucleótido a la cadena, se libera un protón (H⁺), lo que modifica el pH. La detección de estos cambios de pH es lo que permite determinar la secuencia.

Por otro lado, los secuenciadores de Illumina se basan en la síntesis de ADN, a través de la terminación cíclica reversible: se incorporan nucleótidos terminadores marcados con fluorescencia que son retirados para que se pueda continuar con la síntesis. Este proceso tiene lugar sobre un soporte físico denominado *Flow cell*. El secuenciador capta la fluorescencia emitida durante la síntesis del ADN en forma de imágenes a través de canales ópticos de las cámaras LED.

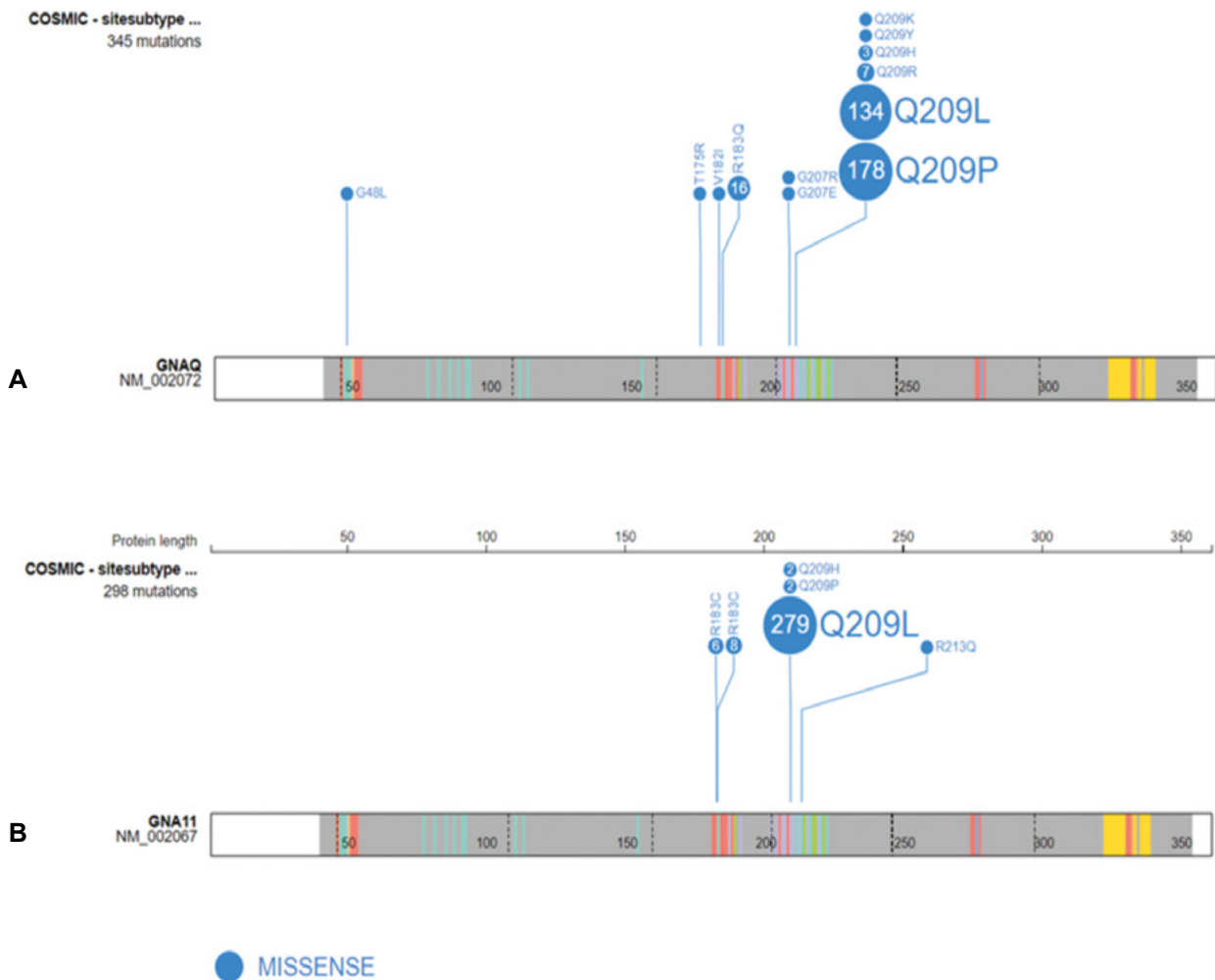


Fig. 8: Representación gráfica de la distribución de mutaciones puntuales de los genes *GNAQ* (A) y *GNA11* (B) en MU utilizando la base de datos COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>) y la aplicación web ProteinPaint, <https://pecan.stjude.org/proteinpaint/>. Las mutaciones en *GNAQ* y *GNA11* se presentan de manera mutuamente excluyente y afectan casi en su totalidad al codón Q209 (exón 5). En un porcentaje menor de los casos el codón afectado es el R183 (exón 4).

Hoy en día las técnicas de NGS nos permiten secuenciar: 1. El genoma completo (regiones codificantes y no codificantes), 2. El exoma completo (solo regiones que codifican para proteínas) y 3. Paneles de genes dirigidos (selección de genes de interés enteros o solo *hotspots*). Son precisamente estos últimos los que han demostrado ser de gran utilidad en el estudio integral de los tumores al combinar la secuenciación de ADN o/y RNA, pudiendo dar información sobre mutaciones, alteraciones en el número de copias o fusiones y reordenamientos génicos (fig. 10).

Una de las principales ventajas que ofrece la NGS es la posibilidad de diseñar paneles específicos que contengan los genes más relevantes en

MU y que simultáneamente ofrezcan información completa sobre las alteraciones cromosómicas (48). Además, cuenta con la posibilidad de aumentar o modificar los genes de interés que contiene el panel en función de los conocimientos disponibles en ese momento.

Entre los inconvenientes a destacar, está el hecho de que esta tecnología no siempre está disponible en todos los centros, ya que los equipos son caros y se requiere de soluciones informáticas para el análisis de los resultados de la secuenciación. Además, existen pocos paneles con marcaje IVD (*In Vitro Diagnostic Medical Devices*), por lo que se requiere de un proceso de validación técnica.

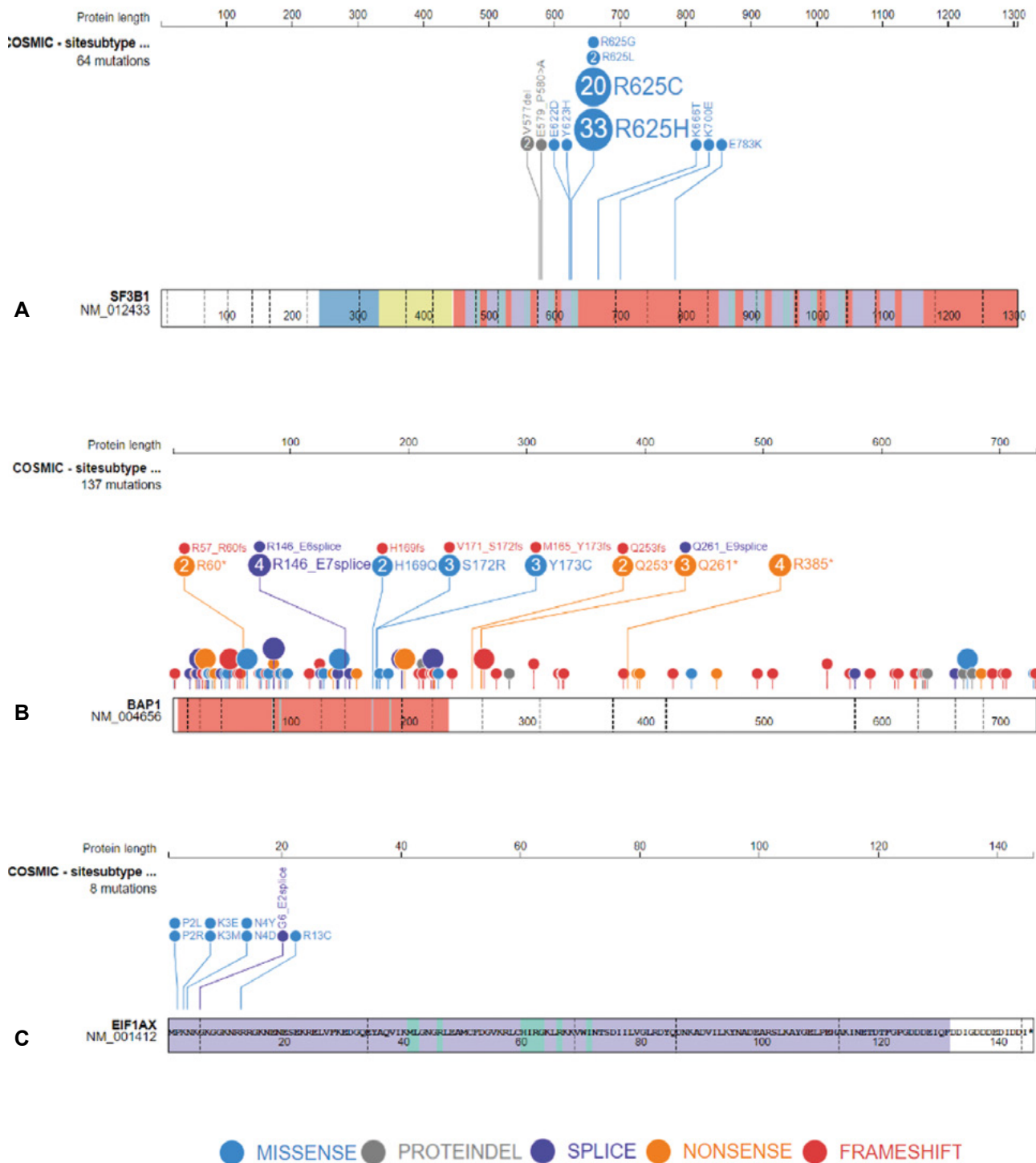


Fig. 9: Representación gráfica de la distribución de los distintos tipos de mutaciones en los genes *SF3B1* (A), *BAP1* (B) y *EIF1AX* (C) en MU utilizando la base de datos COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>) y la aplicación web ProteinPaint, <https://pecan.stjude.org/proteinpaint/>. En el gen *SF3B1* el codón R625 (exón 14) concentra la mayoría de las mutaciones *missense*, y en *EIF1AX* se localizan en el exón 1 y 2. En *BAP1* las mutaciones se encuentran repartidas a lo largo de todo el gen.

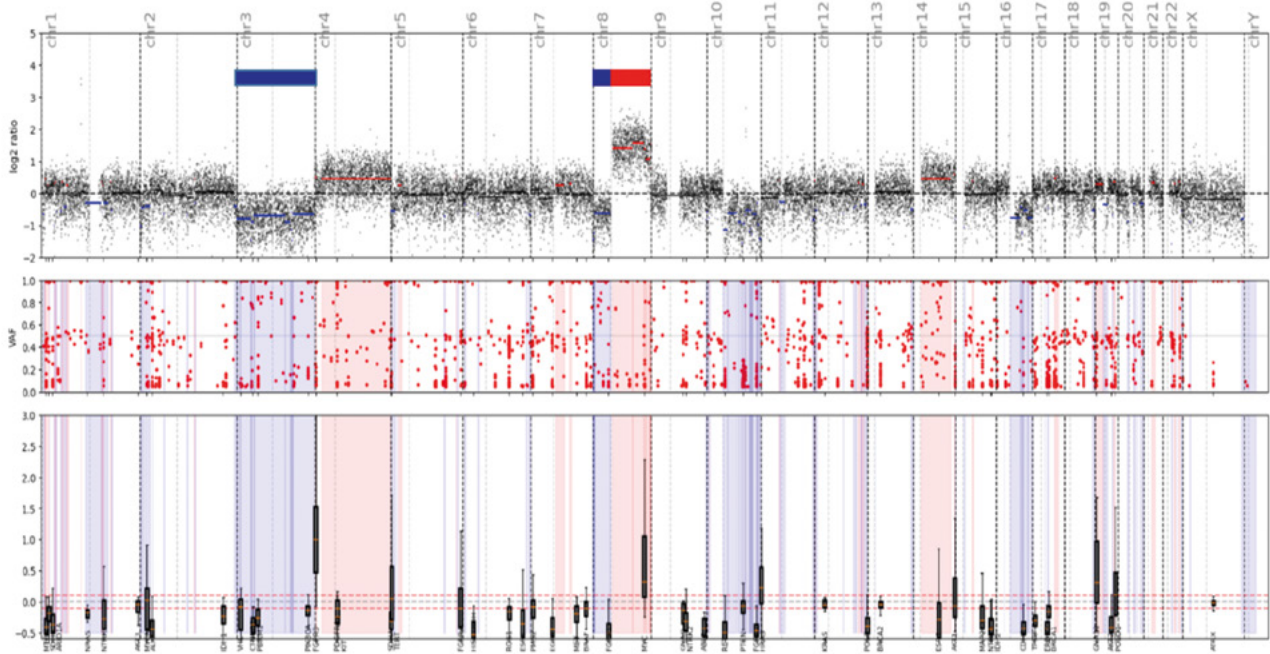


Fig. 10: Perfil obtenido por NGS (*Action OncoKitDx*, *Imegen*) de tumor de MU, mostrando monosomía del cromosoma 3 entero e isocromosoma 8q (pérdida del brazo corto del cromosoma y duplicación del brazo largo). Las pérdidas se indican mediante barras horizontales azules y la ganancia con barras en color rojo.

MENSAJES CLAVE A RECORDAR

- Las mutaciones en *GNAQ*, *GNA11*, *CYSLTR2*, *PLCB4*, *BAP1*, *SF3B1* y *EIF1AX* están implicadas en el desarrollo del MU.
- La metilación del DNA, la modificación de histonas y los miRNAs son alteraciones epigenéticas que favorecen la evolución oncogénica del MU.
- Las vías de señalización aberrantes MAPK y AKT están involucradas en la progresión del MU y su metástasis.
- Existen diferentes aproximaciones para el análisis de las alteraciones moleculares ligadas a MU.
- Las nuevas técnicas moleculares permiten un estudio integrado tanto de las alteraciones citogenéticas como de las mutaciones, las cuales resultan determinantes para predecir el pronóstico del paciente y poder realizar un seguimiento individualizado dentro de lo que representa la medicina de precisión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017; 9(1): 34.
2. Smit KN, Jager MJ, de Klein A, Kiliç E. Uveal melanoma: Towards a molecular understanding. *Prog Retin Eye Res.* 2020;75(September 2019).
3. Robertson AG, Shih J, Yau C, et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell.* 2017; 32(2): 204-220.e15.
4. Moore AR, Ceraudo E, Sher JJ, et al. Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor *CYSLTR2* in uveal melanoma. *Nat Genet.* 2016; 48(6): 675-680.
5. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of *GNAQ* in uveal melanoma and blue naevi. *Nature.* 2009; 457(7229): 599-602.
6. Royer-Bertrand B, Torsello M, Rimoldi D, et al. Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing. *Am J Hum Genet.* 2016; 99(5): 1190-1198.
7. Harbour JW, Onken MD, Roberson EDO, et al. Frequent mutation of *BAP1* in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010; 330(6009): 1410-1413.
8. Karlsson J, Nilsson LM, Mitra S, et al. Molecular profiling of driver events in metastatic uveal melanoma. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 1-13.
9. Darman RB, Seiler M, Agrawal AA, et al. Cancer-Associated *SF3B1* Hotspot Mutations Induce Cryptic 3' Splice Site Selection through Use of a Different Branch Point. *Cell Rep.* 2015; 13(5): 1033-1045.
10. Yavuziyigitoglu S, Koopmans AE, Verdijk RM, et al. Uveal Melanomas with *SF3B1* Mutations. *Ophthalmology.* 2016; 123(5): 1118-1128.
11. Martin M, Maßhöfer L, Temming P, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in *EIF1AX* and *SF3B1* in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet.* 2013; 45(8): 933-936.

12. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A Tumor Suppressor Blocks Cell Cycle Progression and Inhibits Cyclin D1 Accumulation. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(12): 4309-4318.
13. Dratviman-Storobinsky O, Cohen Y, Frenkel S, et al. The Role of RASSF1A in Uveal Melanoma. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2012; 53(6): 2611.
14. Maat W, Beiboer SHW, Jager MJ, Luyten GPM, Gruis NA, van der Velden PA. Epigenetic Regulation Identifies RASEF as a Tumor-Suppressor Gene in Uveal Melanoma. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2008; 49(4): 1291.
15. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, et al. Epigenetic Silencing of the PTEN Gene in Melanoma. *Cancer Res*. 2006; 66(13): 6546-6552.
16. Venza M, Visalli M, Catalano T, et al. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 441(4): 743-750.
17. Yang Z-K, Yang J-Y, Xu Z-Z, Yu W-H. DNA Methylation and Uveal Melanoma. *Chin Med J (Engl)*. 2018; 131(7): 845-851.
18. Ding X, Wang X, Lin M, et al. PAUPAR lncRNA suppresses tumorigenesis by H3K4 demethylation in uveal melanoma. *FEBS Lett*. 2016; 590(12): 1729-1738.
19. Achberger S, Aldrich W, Tubbs R, Crabb JW, Singh AD, Triozzi PL. Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease. *Mol Immunol*. 2014; 58(2): 182-186.
20. Chen X, He D, Dong X Da, et al. MicroRNA-124a Is Epigenetically Regulated and Acts as a Tumor Suppressor by Controlling Multiple Targets in Uveal Melanoma. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2013; 54(3): 2248.
21. Venkatesan N, Kanwar J, Deepa PR, et al. Clinico-Pathological Association of Delineated miRNAs in Uveal Melanoma with Monosomy 3/Disomy 3 Chromosomal Aberrations. *Li Z, ed. PLoS One*. 2016; 11(1): e0146128.
22. Coupland SE, Bechrakis N, Schuler A, et al. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*. 1998; 82(8): 961-970.
23. van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, et al. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res*. 2001; 61(13): 5303-5306.
24. Mouti MA, Dee C, Coupland SE, Hurlstone AFL. Minimal contribution of ERK1/2-MAPK signalling towards the maintenance of oncogenic GNAQQ209P-driven uveal melanomas in zebrafish. *Oncotarget*. 2016; 7(26): 39654-39670.
25. Gardner FP, Serie DJ, Salomao DR, et al. c-MET expression in primary and liver metastases in uveal melanoma. *Melanoma Res*. 2014; 24(6): 617-620.
26. Yoshida M, Selvan S, McCue PA, et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in metastatic uveal melanoma and implications for potential autocrine and paracrine tumor cell growth. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014; 27(2): 297-308.
27. Mouriaux F, Kherrouche Z, Maurage C-A, Demailly F-X, Labalette P, Saule S. Expression of the c-kit receptor in choroidal melanomas. *Melanoma Res*. 2003; 13(2): 161-166.
28. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res*. 2003; 63(11): 2881-2890.
29. Sheidow TG, Hooper PL, Crukley C, Young J, Heathcote JG. Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. *Br J Ophthalmol*. 2000; 84(7): 750-756.
30. Anastassiou G, Tschentscher F, Zeschnigk M, Bornfeld N. Cadherin Expression in Uveal Melanoma. *Exp Eye Res*. 2002; 74(3): 423-425.
31. Zuidervaart W, Pavey S, van Nieuwpoort FA, et al. Expression of Wnt5a and its downstream effector β -catenin in uveal melanoma. *Melanoma Res*. 2007; 17(6): 380-386.
32. Liu Y, Du H, Wan Q, et al. A Novel Four Genes of Prognostic Signature for Uveal Melanoma. *Wang J, ed. J Oncol*. 2022; 2022: 1-20.
33. Akhtar M, Haider A, Rashid S, Al-Nabet ADMH. Paget's «seed and Soil» Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol*. 2019; 26(1): 69-74.
34. Amaro A, Gangemi R, Piaggio F, et al. The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017; 36(1): 109-140.
35. Bustamante P, Piquet L, Landreville S, Burnier J V. Uveal melanoma pathobiology: Metastasis to the liver. *Semin Cancer Biol*. 2021; 71(May 2020): 65-85.
36. Wu X, Zhou J, Rogers AM, et al. C-Met, epidermal growth factor receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor are important for growth in uveal melanoma and independently contribute to migration and metastatic potential. *Melanoma Res*. 2012; 22(2): 123-132.
37. Jager MJ, Brouwer NJ, Esmali B. The Cancer Genome Atlas Project: An Integrated Molecular View of Uveal Melanoma. *Ophthalmology*. 2018; 125(8): 1139-1142.
38. Park JJ, Diefenbach RJ, Joshua AM, Kefford RF, Carlino MS, Rizos H. Oncogenic signaling in uveal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018; 31(6): 661-672.
39. Field MG, Decatur CL, Kurtenbach S, et al. PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(5): 1234-1242.
40. Aronow M, Sun Y, Sauntharajah Y, et al. Monosomy 3 by FISH in Uveal Melanoma: Variability in Techniques and Results. *Surv Ophthalmol*. 2012; 57(5): 463-473.
41. Rodrigues M, Ait Rais K, Salviat F, et al. Association of Partial Chromosome 3 Deletion in Uveal Melanomas With Metastasis-Free Survival. *JAMA Ophthalmol*. 2020; 138(2): 182.
42. Gel B, Serra E. karyoploteR: an R/Bioconductor package to plot customizable genomes displaying arbitrary data. *Hancock J, ed. Bioinformatics*. 2017; 33(19): 3088-3090.
43. White VA, McNeil BK, Horsman DE. Acquired Homozygosity (Isodisomy) of Chromosome 3 in Uveal Melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; 102(1): 40-45.
44. Schouten JP. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(12): 57e - 57.
45. Vaarwater J, van den Bosch T, Mensink HW, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification equals fluorescence in-situ hybridization for the identification of patients at risk for metastatic disease in uveal melanoma. *Melanoma Res*. 2012; 22(1): 30-37.
46. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; 74(12): 5463-5467.
47. Colàs-Campàs L, Blanco-Silvente L, Espallargues-Carerras M. Secuenciación de Nueva Generación (NGS) Para El Diagnóstico Molecular y Selección de Dianas Terapéuticas En Enfermedades Oncológicas: Ficha de Evaluación de Tecnologías Sanitarias Nuevas y Emergentes. *Scientia*; 2021.
48. Thornton S, Coupland S, Olohan L, et al. Targeted Next-Generation Sequencing of 117 Routine Clinical Samples Provides Further Insights into the Molecular Landscape of Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(4): 1039.