TESIS DOCTORAL

BASES GENÉTICAS DEL MELANOMA UVEAL: PREDISPOSICIÓN Y PRONÓSTICO ASOCIADO A LA VARIACIÓN GENÉTICA

Paula Silva Rodríguez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA
AÑO 2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

Bases genéticas del melanoma uveal: predisposición y pronóstico asociado a la variación genética

D./Dña. Paula Silva Rodríguez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) La tesis es la versión definitiva presentada para a su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otrostítulos.

En Santiago de Compostela, 12 de julio de 2021

Fdo. Paula Silva Rodríguez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

[Bases genéticas del melanoma uveal: predisposición y pronóstico asociado a la variación genética]

D. Antonio Piñeiro Ces (director)
Dña. Lourdes Loidi Fernández de Trocóniz (directora)
D. Fernando Domínguez Puente (tutor)

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. Paula Silva Rodríguez, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis de doctorado es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 12 de Julio de 2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Yo, Paula Silva Rodríguez, con DNI 54125428B, declaro no tener conflictos de interés en relación a la presente tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 12 de julio de 2021

Fdo. Paula Silva Rodríguez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”

Marie Curie

A mi madre, por dar todo
sin pedir nada a cambio.
A ti, papá

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Cuando uno decide tomar la decisión de realizar una tesis doctoral, no sabe realmente el camino que está comenzando. En un principio, la incertidumbre lo enmascara todo, pero igualmente son muchas las ganas de iniciar la inmersión total en un nuevo reto. En mi caso, el camino ha sido fácil, muy gratificante y lleno de aprendizaje y, todo ello se lo debo a las personas que han formado parte del mismo.

En primer lugar, me gustaría agradecer profundamente a mi directora, la Dra. Lourdes Loidi, por haberme animado a dar este paso. Gracias Luli, por tu apoyo y tu confianza en mí desde el primer momento. Gracias por todo el conocimiento y profesionalidad que me has transmitido a lo largo de estos años. En base a ello, he podido confirmar que la genética clínica es mi vocación. Gracias por estar siempre. Gracias también, por ofrecerme la oportunidad de hacer mi tesis doctoral sobre el melanoma uveal, ese gran desconocido, que me permitió, además, entrar en contacto con todas las personas que han sido cruciales en esta etapa.

Gracias a mi director, el Dr. Antonio Piñeiro, quien sin conocerme decidió darme la gran oportunidad de acercar mi vocación al estudio del melanoma uveal y al apasionante mundo de la oftalmología. Gracias por permitirme ver cómo trabajan otros grupos internacionales y mostrar, también, cómo lo hacemos nosotros. Por ser fiel defensor del trabajo multidisciplinar. Ha sido un verdadero privilegio contar con tu orientación y aprender de tu dedicación.

Gracias a mi tutor, el Dr. Fernando Domínguez, sin cuya guía y respaldo académico, la ejecución de esta tesis doctoral no habría sido posible.

Gracias, especialmente, a la Dra. María Pardo. María, tu bagaje científico, tus ganas y tu lucha constante, han sido todo un ejemplo a seguir. Tu implicación desde un primer momento en esta tesis doctoral, es el reflejo de tu visión de la investigación. Gracias.

Gracias a los miembros del grupo de investigación en Obesidómica, a Nerea y a Tamara, siempre dispuestas a ayudar.

Gracias a todos los profesionales de la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores intraoculares del Adulto. En especial, me gustaría agradecer a la Dra. María José Blanco Teijeiro y al Dr. Manuel Bande. Marisé, gracias por reafirmar mi creencia de que la medicina es vocación, por tu profesionalidad

y tu buena disposición. Sin tu trabajo y deseo de colaboración, nada habría sido posible. Manuel, gracias por tus consejos, tu dedicación y tu ayuda en lo profesional y lo personal. Gracias a Dani, por dedicar parte de su tiempo a colaborar en esta tesis.

Gracias a todo el personal, sin excepción, de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. Especialmente:

A Miriam, Eva y Pili, por vuestro apoyo y por hacer que el laboratorio fuese mi refugio en tantas ocasiones.

A Pancho, por todo lo que he aprendido de su experiencia en la genética.

A todo el personal técnico del laboratorio central. Bego y Ro, me enseñasteis a materializar la idea de PCR mucho antes de adentrarme en esta aventura.

Al personal técnico de extracción, sobre todo a Marga y Lucía. Luci, gracias por tu tiempo, gran parte de esta tesis resulta de tu rigor profesional.

A las unidades de secuenciación masiva y bioinformática, fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A Miguel, por sus deseos de ánimo constantes.

A mis compañeras/os de cito, de los cuales he aprendido mucho, por su apoyo y ánimo en esta última etapa.

Gracias a todos los pacientes que han colaborado en este estudio.

A todas/os mis amigos/as. A mis *Afteraguers;* Bel, Sara, Anomo, Anita, Ali, Patri Anta, Ire, Ine, Patri, Tis, Moni y Car, por vuestro apoyo y ánimos constantes. Mujeres fuertes y profesionales. Toda una inspiración. Car, mi segunda hermana, gracias por acompañarme todos estos años, por creer en mí como nadie y por nuestras andanzas juntas.

Gracias Alberto, por darme alas, por confiar en que podría, por tu apoyo y valoración incondicional. Eres un pilar fundamental.

Gracias a mi familia. A los que están y a los que ya no. A mi hermana, Maru, un modelo a seguir.

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS 11
ÍNDICE 13
ABREVIATURAS 27
LISTA DE PUBLICACIONES 29
I. RESUMEN 33
II. INTRODUCCIÓN GENERAL AL MELANOMA UVEAL 35
II. INTRODUCCIÓN GENERAL 37
II. 1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL MELANOMA UVEAL 37
II. 2. FISIOPATOLOGÍA DEL MU 42
II. 2.1 Origen y transformación del nevus ocular en MU 42
II. 2.2 Consideraciones anatómicas y características clínicas 44
II. 2.2.1 Melanoma de iris 45
II. 2.2.2 Melanoma de cuerpo ciliar 46
II. 2.2.3 Melanoma de coroides 47
II. 3. FACTORES DEL RIESGO 49
II. 3.1 Origen étnico 49
II. 3.2 Radiación ultravioleta y otros factores ambientales 49
II. 3.3 Asociaciones fenotípicas 50
II. 3.3.1 Melanocitosis 50
II. 3.3.2 Síndromes asociados 50
II. 3.3.3 Predisposición genética 51
II. 4. DIAGNÓSTICO, SEGUIMIENTO Y PREVENCIÓN 52
II. 4.1 Signos y síntomas del MU 52
II. 4.2 Técnicas diagnósticas y exploración oftalmológica 53
II. 5. METÁSTASIS 56
II. 6. FACTORES PRONÓSTICO 58

II. 6.1 Factores clínicos.....59
II. 6.1.1 Edad de presentación y sexo.....59
II. 6.1.2 Tamaño del tumor.....60
II. 6.1.3 Localización intraocular.....61
II. 6.1.4 Extensión extraescleral.....62
II. 6.1.5 Melanocitosis ocular/oculodérmica.....62
II. 6.2 Factores histopatológicos.....63
II. 6.2.1 Tipo celular.....63
II. 6.2.2 Actividad mitótica.....64
II. 6.2.3 Densidad de microvascularización.....64
II. 6.2.4 Infiltración tumoral; linfocitos y macrófagos.....64
II. 6.3 Factores moleculares y genéticos.....65
II. 6.3.1 Biomarcadores séricos.....65
II. 6.3.2 Proteínas identificadas a partir de cultivos celulares.....66
II. 6.3.3 Factores citogenéticos.....67
II. 6.3.4 Mutaciones somáticas.....68
II. 6.3.5 Epigenética.....68
II. 6.3.6 Perfil de expresión génica.....69
II. 7. TRATAMIENTO.....70
II. 7.1 Tratamiento del MU primario.....70
II. 7.1.1 Radioterapia.....70
II. 7.1.1.1 Braquiterapia.....70
II. 7.1.1.2 Haz de protones.....71
II. 7.1.1.3 Radiación estereotáctica.....71
II. 7.1.2 Cirugías.....72
II. 7.1.2.1 Enucleación.....72
II. 7.1.2.2 Resección local.....72

II. 7.1.3 Terapias con láser o fototerapia 72
II. 7.1.3.1 Terapia fotodinámica 72
II. 7.1.3.2 Termoterapia transpupilar 73
II. 7.2 Tratamiento en la enfermedad metastásica 73
III. ESTUDIOS REALIZADOS 77
CAPÍTULO 1: BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES DE PREDISPOSICIÓN A MELANOMA UVEAL BILATERAL MEDIANTE UNA ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA 79
C1. 1. INTRODUCCIÓN 81
C1. 1.1 El melanoma uveal bilateral primario 81
C1. 1.1.1 Tasa de incidencia 81
C1. 1.1.2 Causa, factores de riesgo, tratamiento y pronóstico 82
C1. 1.2 Predisposición genética frente al melanoma uveal 85
C1. 1.2.1 Evidencia epidemiológica 85
C1. 1.2.2 Estudio de genes de predisposición 86
C1. 1.2.3 El gen *BAP1*; estructura y función 87
C1. 1.2.3.1 Mutaciones germinales en *BAP1* 89
C1. 1.2.3.2 Síndrome de predisposición a tumores asociado a *BAP1* 90
C1. 1.2.3.3 El MU familiar 91
C1. 1.2.3.4 El MU en pacientes jóvenes 92
C1. 1.2.3.5 Formas bilaterales o multifocales 92
C1. 1.2.3.6 Genes relacionados con factores de riesgo a MU 92
C1. 1.3 Identificación de genes causales en enfermedades mendelianas 93
C1. 1.3.1 Secuenciación de nueva generación 94
C1. 1.3.1.1 Concepto y contextualización histórica 94

C1. 1.3.1.2 Aplicación clínica 95
C1. 1.3.1.3 Secuenciación de exomas 96
C1. 1.4 Etapas del proceso de secuenciación 99
C1. 1.4.1 Aspectos técnicos 99
C1. 1.4.2 Análisis bioinformático, filtrado y priorización de variantes genéticas 100
C1. 1.4.2.1 Herramientas bioinformáticas de predicción *in silico* de patogenicidad 106
C1. 1.4.3 Validación clínica de las asociaciones gen-enfermedad 109
C1. 2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN 113
C1. 2.1 Objetivo principal 113
C1. 2.2 Objetivos específicos 113
C1. 3. MATERIALES Y MÉTODOS 115
C1. 3.1 Cohorte de pacientes 115
C1. 3.2 Descripción clínica de los pacientes 116
C1. 3.2.1 Paciente 1 (MUB1) 116
C1. 3.2.2 Paciente 2 (MUB2) 118
C1. 3.2.3 Paciente 3 (MUB3) 119
C1. 3.2.4 Paciente 4 (MUB4) 120
C1. 3.3 Muestras utilizadas y obtención de las mismas 122
C1. 3.4 Panel de genes de predisposición a melanoma 123
C1. 3.5 Exomas dirigidos 125
C1. 3.5.1 SureSelectXT Focused Exome 125
C1. 3.5.2 IDT_xGEN Exome Research panel 126
C1. 3.6 Estudio del gen *TERF2IP* 127
C1. 3.7 Selección e interpretación de variantes genéticas 128
C1. 3.7.1 Estrategia de filtrado o cribado 128

C1. 3.7.2 Priorización e interpretación de las variantes 128
C1. 3.7.3 Estudio de las variantes de significado incierto..... 130
C1. 3.8 Análisis estadístico 131
C1. 4. RESULTADOS 133
C1. 4.1 Panel de genes de predisposición a melanoma..... 133
C1. 4.2 Resultados de la secuenciación de exomas dirigidos 133
C1. 4.2.1 Total de variantes identificadas y datos de cobertura 134
C1. 4.2.1.1 Estudio del gen *BAP1* 135
C1. 4.2.2 Resultados de la secuenciación de exomas dirigidos 136
C1. 4.2.2.1 Variantes de interés clínico en el paciente MUB1 136
C1. 4.2.2.2 Variantes de interés clínico en el paciente MUB2 137
C1. 4.2.2.3 Variantes de interés clínico en el paciente MUB3 137
C1. 4.2.2.4 Variantes de interés clínico en el paciente MUB4 138
C1. 4.2.3 Secuenciación de gen *TERF2IP* en los pacientes MUB1-MUB3 138
C1. 4.2.4 Posible correlación genotipo-fenotipo..... 146
C1. 4.3 Incidencia de variantes patogénicas en los genes candidatos en población control..... 150
C1. 4.3.1 Estimación de la incidencia de variantes nulas en los genes *POLN, BAX, TERF2IP* y *RBBP8* 150
C1. 4.3.2 Estimación de la incidencia de variantes patogénicas en población control en otros genes priorizados..... 152
C1. 4.4 Propuesta de posibles genes candidatos 152
C1. 5. DISCUSIÓN 155
C1. 5.1 Predisposición genética frente al melanoma uveal bilateral

.....156
C1. 5.2 Variantes patogénicas o probablemente patogénicas en genes implicados en predisposición a cáncer.....158
C1. 5.3 Otras variantes patogénicas descritas con posible interés 163
C1. 5.4 Variantes priorizadas como probablemente patogénicas..164
C1. 5.5 Estudio de las variantes de significado incierto.....171
C1. 5.5.1 Genes implicados en rutas de señalización de cáncer171
C1. 5.5.2 Genes implicados en rutas de reparación de daños en el ADN.....173
CAPÍTULO 2: BIOPSIA PRONÓSTICA EN EL MELANOMA UVEAL: ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS.....177
C2 1. INTRODUCCIÓN.....179
C2. 1.1 Biopsia pronóstica en el melanoma uveal 179
C2. 1.1.1 Alteraciones citogenéticas.....181
C2. 1.1.1.1 Cromosoma 3 183
C2. 1.1.1.2 Cromosoma 1 184
C2. 1.1.1.3 Cromosoma 6 184
C2. 1.1.1.4 Cromosoma 8 185
C2. 1.1.1.5 Otras alteraciones cromosómicas 186
C2. 1.2 Técnicas de análisis genético aplicadas en la biopsia pronóstica en melanoma uveal 186
C2. 1.2.1 Estudio de alteraciones cromosómicas 186
C2. 1.2.1.1 Citogenética convencional 186
C2. 1.2.1.2 Marcaje mediante sondas 187
C2. 1.2.1.3 Estudio de ADN 187
C2. 1.2.2 Estudio de expresión génica.....188
C2. 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....191

C2. 3. MATERIALES Y MÉTODOS 193
C2. 3.1 Criterios de inclusión y exclusión 193
C2. 3.1.1 Criterios de inclusión 193
C2. 3.1.2 Criterios de exclusión 193
C2. 3.2 Pacientes y muestras 194
C2. 3.3 Extracción de ADN tumoral 194
C2. 3.4 Estudio de las alteraciones cromosómicas mediante multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 195
C2. 3.5 Electroforesis capilar y análisis de fragmentos 197
C2. 3.6 Análisis estadístico de los datos 197
C2. 4. RESULTADOS 199
C2. 4.1 Características clínicas e histopatológicas 199
C2. 4.2 Alteraciones cromosómicas 202
C2. 4.2.1 Rendimiento diagnóstico, prevalencia y distribución en la cohorte 202
C2. 4.2.1.1 Cromosoma 3 203
C2. 4.2.1.2 Cromosoma 1p 204
C2. 4.2.1.3 Cromosoma 6 204
C2. 4.2.1.4 Cromosoma 8 204
C2. 4.2.2 Asociación monosomía 3 con las características clínicas e histopatológicas 205
C2. 4.3 Descripción detallada de los MU metastásicos 206
C2. 4.4 Estudio en detalle de MU recidivantes 209
C2. 4.4.1 Recidiva post-terapia ionizante 209
C2. 4.4.2 Recidiva post-braquiterapia 210
C2. 4.5 Estudios de asociación con el riesgo de metástasis 211
C2. 4.5.1 Características clínicas e histopatológicas y riesgo de metástasis 211

C2. 4.5.2 Alteraciones cromosómicas y riesgo de metástasis ...211
C2. 4.6 Estudios de supervivencia....212
C2. 4.6.1 Supervivencia asociada a alteraciones cromosómicas 212
C2. 4.6.2. Supervivencia asociada a características clínicas e histopatológicas 216
C2. 5. DISCUSIÓN....219
C2. 5.1 Características clínicas de la cohorte....220
C2. 5.2 Perfil de alteraciones cromosómicas 221
C2. 5.2.1 Monosomía 3 221
C2. 5.2.2 Prevalencia de otras alteraciones cromosómicas y su asociación con la monosomía 3 222
C2. 5.3 Alteraciones cromosómicas y características clínico-demográficas en la enfermedad metastásica 224
C2. 5.4 Pros, contras y perspectivas futuras de la biopsia pronóstica en el MU....227
CAPÍTULO 3: PRONÓSTICO DEL MELANOMA UVEAL ASOCIADO AL ESTUDIO DE MUTACIONES SOMÁTICAS Y ALTERACIONES CROMOSÓMICAS....233
C3. 1. INTRODUCCIÓN....235
C3. 1.1 Secuenciación de nueva generación en oncología; resumen del escenario actual 235
C3. 1.2 Características del perfil mutacional en el melanoma uveal 237
C3. 1.2.1 Diferencias respecto al melanoma maligno cutáneo..237
C3. 1.3 Genes típicamente mutados en el melanoma uveal 240
C3. 1.3.1 Mutaciones iniciadoras 242
C3. 1.3.1.1 Genes *GNAQ* Y *GNA11* 242
C3. 1.3.1.2 Gen *CYSLTR2*....244

C3. 1.3.1.3 Gen *PLCB4* 245
C3. 1.3.2 Mutaciones con valor pronóstico 245
C3. 1.3.2.1 Gen *BAP1* 246
C3. 1.3.2.2 Gen *SF3B1* 247
C3. 1.3.2.3 Gen *EIF1AX* 249
C3. 1.3.3 Gen *LZTS1* 251
C3. 1.3.4 Gen *BRAF* 251
C3. 1.4 Pasos del proceso de carcinogénesis en el melanoma uveal 252
C3. 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO 255
C3. 3. MATERIALES Y MÉTODOS 257
C3. 3.1 Criterios de inclusión y exclusión 257
C3. 3.1.1 Criterios de inclusión 257
C3. 3.1.2 Criterios de exclusión 257
C3. 3.2 Muestras tumorales de melanoma uveal 258
C3. 3.3 Muestras de ADN tumoral empleadas 258
C3. 3.4 Análisis de alteraciones en el número de copias 259
C3. 3.5 Panel de genes AmpliSeq-melanoma uveal 259
C3. 3.5.1 Características técnicas 259
C3. 3.5.2 Anotación y análisis técnico de las variantes 260
C3. 3.5.3 Estrategia de filtrado de las variantes 261
C3. 3.6 Secuenciación sanger del *hotspot* mutacional en el gen *CYSLTR2* 262
C3. 3.7 Nomenclatura de las variantes genéticas 263
C3. 3.8 Análisis estadístico 263
C3. 4. RESULTADOS 265
C3. 4.1 Características clínicas de los pacientes y muestras tumorales analizadas 267

C3. 4.2 Resultado de las alteraciones somáticas en el número de copias (MLPA) 268
C3. 4.3 Resultados del análisis del perfil mutacional 269
C3. 4.3.1 Mutaciones en genes con función oncogénica 269
C3. 4.3.1.1 Mutaciones en los genes *GNAQ* y *GNA11* 269
C3. 4.3.1.2 Mutaciones en *PLCB4* 270
C3. 4.3.1.3 Mutaciones en *CYSLTR2* 271
C3. 4.3.2 Mutaciones en genes con valor pronóstico 271
C3. 4.3.2.1 Mutaciones en *BAP1* 272
C3. 4.3.2.2 Mutaciones en *SF3B1* 276
C3. 4.3.2.3 Mutaciones en *EIF1AX* 277
C3. 4.3.3 Mutaciones identificadas en los genes *LZTS1* y *BRAF* 278
C3. 4.3.3.1 Gen *LZTS1* 278
C3. 4.3.3.2 Gen *BRAF* 279
C3. 4.4 Resultados de la asociación entre el perfil clínico-molecular de los melanomas uveales y el riesgo de metástasis 279
C3. 4.4.1 Características clínicas e histopatológicas y riesgo de metástasis 279
C3. 4.4.2 Alteraciones cromosómicas y riesgo de metástasis 280
C3. 4.4.3 Mutaciones somáticas y riesgo de metástasis 281
C3. 4.5 Análisis de supervivencia 283
C3. 4.5.1 Estudio de la supervivencia asociada a la presencia de alteraciones cromosómicas 283
C3. 4.5.2 Estudio de la supervivencia asociada a características clínico-anatómicas 284
C3. 4.5.3 Estudio de la supervivencia asociada a la presencia de mutaciones somáticas en los distintos genes 284
C3. 4.5.3.1 Genes conductores oncogénicos 284

C3. 4.5.3.2 Genes con valor pronóstico 288
C3. 4.5.3.3 Gen *LZTS1* 293
C3. 5. DISCUSIÓN 295
C3. 5.1 Diseño del panel de genes y métricas de calidad de la secuenciación masiva 295
C3. 5.2 Características clínico-patológicas y riesgo de metástasis 298
C3. 5.3 Alteraciones cromosómicas en el MU: frecuencia y asociación con enfermedad metastásica 298
C3. 5.4 Frecuencia de mutaciones somáticas; asociación con las características clínico-patológicas y supervivencia 300
C3. 5.4.1 Mutaciones iniciadoras 301
C3. 5.4.2 Mutaciones con valor pronóstico 304
C3. 5.4.2.1 Estudio mutacional del gen *BAP1* 304
C3. 5.4.2.2 Estudio mutacional de los genes *SF3B1* y *EIF1AX* 307
C3. 5.4.3 Secuenciación del gen *LZTS1* 309
C3. 5.4.4 Secuenciación del gen *BRAF* 310
C3. 5.5 Limitaciones del estudio y perspectivas futuras 311
IV. DISCUSIÓN FINAL 315
IV. DISCUSIÓN FINAL 317
IV.1. Discusión final de los hallazgos más representativos 317
IV.1.1 Capítulo 1: Búsqueda de genes de predisposición a melanoma uveal bilateral primario 317
IV.2.2 Capítulos 2 y 3: Pronóstico de los pacientes con melanoma uveal asociado al estudio de alteraciones cromosómicas y mutaciones somáticas 322
IV.2. Escenario presente y futuro de la investigación en el melanoma uveal 325
IV.3. Alcance científico de la tesis doctoral 328

V. CONCLUSIONES 331
VI. BIBLIOGRAFÍA 337
VII. ANEXOS 373

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

ACMG: American College of Medical Genetics

ARNm: ARN mensajero

BAAF: Biopsia-Aspiración con aguja fina

BAP1: BRCA1 Associated Protein-1

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CHUS: Hospital Universitario de Santiago de Compostela

ClinVar: Clinical Variation

CNV: Copy Number Variation

COMS: Collaborative Ocular Melanoma Study

COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

D3: disomía 3

EUROCARE: European Cancer Registry-based study on survival and care of cancer patients

FISH: Fluorescence *in situ* hybridization

FPGMX: Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica

GEP: Gene Expression Profile

GnomAD: The Genome Aggregation Database

HGMD: Human Gene Mutation Database

HGVS: Human Genome Variation Society

HPO: Human Phenotype Ontology

IGV: Integrative Genome Viewer

LCMPT: Lesión Coroidea Melanocítica de Pequeño Tamaño

LOF: Loss of Function

LOH: Loss Of Heterozygosity

MAF: Minor Allele Frequency

MMC: Melanoma Maligno Cutáneo

MLPA: Multiplex ligation-dependent probe amplification

MSA: Microsatellite analysis

MU: Melanoma Uveal

M3: Monosomía 3

MU-D3: Melanoma Uveal con Disomía 3

MU-M3: Melanoma Uveal con Monosomía 3

MUB: Melanoma Uveal Bilateral

MUF: Melanoma Uveal Familiar

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

OR: Odds Ratio

NFE: Non-Finish European

NGS: Next Generation Sequencing

PCR: Polymerase Chain Reaction

SERGAS: Servicio Galego de Saúde

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SNV: Single Nucleotide Variants

TCGA: The Cancer Genome Atlas

URQTIA: Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del adulto

UV: radiación ultravioleta

VAF: Variant Allele Frequency

VUS: Variants of Unknown Significance

LISTA DE PUBLICACIONES

1. ARTÍCULOS INDEXADOS EN *PUBMED* REPRODUCIDOS EN LA TESIS

Título: Role of somatic mutations and chromosomal aberrations in the prognosis of uveal melanoma in a Spanish patient cohort. Acta Ophthalmol (2021). PMID: 33421325.
Identificador: https://doi.org/10.1111/aos.14760
Fecha de primera publicación (Online): 09 January 2021

Autores: Paula Silva-Rodríguez[1,2], Manuel Bande[2,3], Daniel Ferrnández-Díaz[3], Nerea Lago-Baameiro[4], María Pardo[2,4], María José Blanco-Teijeiro[2,3], Fernando Domínguez[1], Lourdes Loidi[1], Antonio Piñeiro[2,3]

Filiaciones:
[1]Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
[2]Tumores Intraoculares en el Adulto, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, España.
[3]Department of Ophthalmology, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
[4]Grupo Obesidómica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, España.

Factor de impacto Web of Science (WoS) 2020: 3,362
Cuartil categoría "Ophthalmology": **Q1**

2. PÓSTERS Y COMUNICACIONES ORALES

2.1 CONGRESOS INTERNACIONALES

Autor: Silva-Rodríguez P, Bande M, Santiago M, Pardo M, Blanco MJ, Domínguez F, Loidi L, Piñeiro A
Título: A deeper insight into chromosomal aberrations, GNAQ/GNA11 and BAP1 somatic mutations in uveal melanoma prognosis. **Comunicación oral impartida por Paula Silva.**
Congreso: European Ocular Oncology Group Annual Meeting (OOG).Londres, 11-13 abril 2019.

Autor: Silva-Rodríguez P, Bande M, Santiago M, Pardo M, Blanco MJ, Domínguez F, Loidi L, Piñeiro A
Título: Bilateral uveal melanoma (BUM): our experience in exome sequencing of three unrelated cases. **Comunicación oral impartida por Paula Silva.**
Congreso: European Ocular Oncology Group Annual Meeting (OOG).Siena, 21-24 marzo 2021.

Autor: Piñeiro A, Silva-Rodríguez P*, Loidi L, Santiago-Varela M, Bande M, Pardo M, Blanco MJ.
Título: Searching for genes predisposing to bilateral Uveal Melanoma (bUM) by exome sequencing of three unrelated cases. **Póster.**
Congreso: The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Baltimore, 7-11 mayo 2017 Maryland.

2.2 CONGRESOS NACIONALES

Autor: Silva-Rodríguez P, Bande M, Fernández-Díaz D, Lago-Baameiro N, Camino Martínez T, Pardo M, Domínguez F, Blanco MJ, Loidi L, Piñeiro A
Título: Utilidad de la biopsia pronóstica en el melanoma uveal. **Comunicación oral impartida por Paula Silva.**
Congreso: I Congreso Virtual de la Sociedad Española de Retina-Vítreo (SERV); 16 mayo 2020.

Autor: Silva-Rodríguez P, Bande M, Santiago M, Pardo M, Blanco MJ, Domínguez F, Loidi L, Piñeiro A
Título: Búsqueda de genes de predisposición a melanoma uveal bilateral mediante secuenciación masiva. **Comunicación oral impartida por Paula Silva.**
Congreso: Reunión SERV≤40 Sociedad Española de Retina-Vítreo (SERV); Madrid, 7-9 marzo 2019.

Autor: Silva-Rodríguez P, Bande M, Santiago M, Pardo M, Blanco MJ, Domínguez F, Loidi L, Piñeiro A
Título: Búsqueda de genes de predisposición a melanoma uveal bilateral mediante secuenciación masiva. **Póster**
Congreso: Sociedad Española de Retina-Vítreo (SERV). Madrid, 7-9 marzo 2019.

Autor: Silva-Rodríguez P, Bande M, Santiago M, Pardo M, Blanco MJ, Domínguez F, Loidi L, Piñeiro A
Título: Utilidad de la secuenciación de exomas para la identificación de predisposición a melanoma uveal bilateral. **Comunicación oral impartida por Paula Silva.**
Congreso: Sociedad Española de Oftalmología (SEO). Granada, 26-29 septiembre, 2018.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I. RESUMEN

El melanoma uveal (MU), es el tumor intraocular primario más frecuente en población adulta y la forma más común de melanoma no-cutáneo, a pesar de su reducida incidencia. Su aparición es generalmente espontánea, aunque se han descrito algunos factores de riesgo asociados a características clínicas, ambientales y genéticas. En cuanto a su pronóstico, aproximadamente el 50% de los pacientes desarrolla metástasis, fundamentalmente hepática. A día de hoy, a pesar de los grandes avances en el control local de la enfermedad, el MU constituye uno de los pocos tipos de cáncer en los cuales la supervivencia de los pacientes se ha mantenido estable en las últimas décadas.

En esta tesis doctoral, se ha abordado el estudio de las bases genéticas del MU desde varias perspectivas, con el objetivo de profundizar en la variación genética asociada tanto a la susceptibilidad o riesgo frente al desarrollo de formas bilaterales de esta neoplasia, como a la variación genética que modifica el pronóstico del MU, influyendo en la supervivencia de los pacientes. Para ello, se desarrollaron tres estudios que siguieron aproximaciones genómicas distintas.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de secuenciación masiva en cuatro pacientes, no relacionados, diagnosticados y tratados de melanoma uveal bilateral primario (MUB), donde estudiando muestras de ADN germinal, se pudieron seleccionar genes sin relación previa conocida con el MU, como sospecha de candidatos a explicar la existencia de una predisposición genética a padecer un MUB.

El MUB,constituye una variante extremadamente rara del MU que radica en la aparición de un MU primario en sendos globos oculares de un mismo paciente. En la actualidad, la cifra de casos reportados bien documentados de MUB en la literatura se sitúa por debajo de sesenta. De manera que tener la oportunidad de explorar cuatro casos de forma

simultánea, constituye de por sí un avance en términos de investigación, aportando información que puede ser empleada por la comunidad científica para profundizar en la genética de este cáncer y su posible causalidad.

Por otro lado, se llevaron a cabo dos estudios focalizados en el análisis de muestras tumorales con el fin de incurrir en el pronóstico de los MU asociado a la variación genética. Mediante estos estudios, se ha podido comprobar que la integración de la información aportada por la presencia de alteraciones en los cromosomas; 1, 3, 6 y 8 y mutaciones somáticas en los genes; *BAP1*, *SF3B1* y *EIF1AX*, permite la detección de los pacientes sometidos a un mayor riesgo genético de desarrollar enfermedad metastásica. El conocimiento de un perfil molecular más específico de cada tumor, facilita el establecimiento de grupos y subgrupos pronóstico de pacientes, que pueden beneficiarse de un seguimiento clínico más exhaustivo, así como de su posible inclusión en ensayos clínicos, en una patología donde el tratamiento continúa siendo meramente local, sin quimioterapias y terapias sistémicas específicas.

Los resultados mostrados en esta tesis doctoral, tienen una clara vertiente traslacional y contribuyen, además, al discernimiento y asentamiento de las bases genéticas del MU.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL AL MELANOMA UVEAL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

II. 1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL MELANOMA UVEAL

El melanoma uveal (MU), es el tumor intraocular primario maligno más común en la población adulta[1]. Este tipo de neoplasias se generan a partir de melanocitos situados en el tracto uveal (iris, coroides y cuerpo ciliar). El MU, es una neoplasia rara que constituye menos del 1% de todos los tipos de cáncer. Pero a pesar de su escasa frecuencia, representa aproximadamente un 5,2% de todos los melanomas, tasa que lo convierte en el melanoma más prevalente después del cutáneo[2].

A nivel mundial, la incidencia de esta neoplasia oscila entre 4,3 y 10,9 casos nuevos al año por millón de habitantes (Tabla 1). Concretamente en Europa, la incidencia se sitúa entre 5-7 casos nuevos al año por millón de habitantes[3,4]. Además, se ha descrito una acentuada diferencia en cuanto a la incidencia de este cáncer entre los distintos grupos poblacionales; siendo mucho mayor en individuos caucásicos no-hispanos que en caucásicos de origen hispano, afro-americanos y asiáticos[5], aunque no se han descrito variaciones en cuanto al pronóstico de la enfermedad en los distintos grupos poblacionales[6].

El registro europeo European Cancer Registry-based study on survival and care of cancer patients (EUROCARE), elaborado entre los años 1983-1994 muestra tasas de incidencia similares a las previamente descritas, con la particularidad de la existencia de un incremento en la incidencia de este tipo de neoplasias de sur a norte de Europa, siendo la incidencia inferior a 2 casos al año por millón de habitantes en España y el sur de Italia y superior a 8 casos al año por millón de habitantes en Noruega y Dinamarca[7]. Estos datos, son, además, consistentes con el incremento de incidencia registrado en Estados Unidos en función del incremento latitudinal[8]. De hecho, se ha visto que el MU afecta de forma mayoritaria a individuos caucásicos, demostrándose un riesgo unas 8 y 3 veces superior en individuos con tez clara, dificultad o

imposibilidad para broncearse e iris claros, que en población africana y asiática, respectivamente[5,9].

En cuanto a la edad, el MU se diagnostica, generalmente, en la sexta década de vida, con una edad media de 55-60 años en la mayor parte de los casos[3,10]. Aunque este tipo de neoplasia se ha descrito en pacientes pertenecientes a todas las franjas de edad, es poco frecuente en niños y adolescentes[11-14], y sólo aproximadamente el 1% de los casos se dan en pacientes jóvenes de edad inferior a 18 años[11]. En un estudio en una cohorte de 8967 pacientes con MU llevado a cabo por Kaliki et al., 122 pacientes (1%) presentaban menos de 20 años, teniendo el paciente más joven 3 años[15]. Por otro lado, el MU congénito es extremadamente raro y sólo se han descrito casos puntuales[16-18]. Así, la tasa de incidencia del MU se incrementa con la edad, alcanzando su pico máximo entorno a los 70 años. Pero la tasa de incidencia ajustada a la edad, se ha mantenido estable en Estados Unidos entre los años 1973 y 1997[3], con un incremento en la edad media de diagnóstico de este tumor entre los años 1973 y 2009, que se atribuye, fundamentalmente, a la creciente esperanza de vida y a una mayor eficacia en la detección de enfermedades oculares[19].

Con respecto al sexo, diversos estudios han sugerido que el MU muestra tasas de incidencia similares en ambos sexos, pero con un ligero incremento en el sexo masculino que no resulta estadísticamente significativo[1,7,20-22]. Así, se ha visto que los hombres tienen una incidencia media ajustada a la edad mayor de 5,9 casos por millón de habitantes frente a una incidencia ajustada a la edad de 4,5 casos por millón de habitantes en mujeres. Y en cuanto a la edad de diagnóstico, en la bibliografía se ha publicado que en mujeres es ligeramente mayor que en el caso de los hombres[3].

Si nos centramos en España, existen muy pocos estudios epidemiológicos del MU publicados y no se dispone de un registro global de incidencia del MU, pero de acuerdo a los datos obtenidos de once registros españoles de tumores, se estima que en España la incidencia de esta neoplasia se sitúa en unos 4 casos al año por millón de habitantes[12]. Además, en los estudios epidemiológicos españoles publicados, se calcula que la edad media de diagnóstico se encuentra en torno a los 60-62,1 años, siendo los varones diagnosticados en una

franja de edad sutilmente más temprana que las mujeres; 61,7 y 62,6 años, respectivamente[12,23].

En cuanto a la supervivencia de los pacientes diagnosticados con MU, independientemente del tratamiento local llevado a cabo, el MU es uno de los pocos tipos de cáncer en los cuales la supervivencia global de los pacientes no ha mejorado en los últimos 40 años[20], aun teniendo en cuenta la mejora obtenida en cuanto a preservación del globo ocular y función visual en los nuevos tratamientos. De hecho, la supervivencia global de los pacientes con MU en la población de Estados Unidos, es del 81% a 5 años después del tratamiento, mientras que en países del norte de Europa como Reino Unido la supervivencia es menor, situándose alrededor del 70%[20,24]. En estudios llevados a cabo en España y otros países como Israel, el índice de supervivencia se sitúa cercano al 90% [25,26].

AUTOR	PERÍODO	PAÍS	UBICACIÓN MELANOMA	Nº CASO	CRITERIOS	INCIDENCIA /MILLÓN/ AÑO
EEUU						
Strickland	1950-1974	EEUU	Melanoma ocular	-	-	9,0 (H) 8,0 (M)
Scotto	1969-1971	EEUU	Melanoma ocular	341	Clínicos	5,6
Singh	1973-1997	EEUU	Melanoma uveal	2493	Clínicos	4,9 (H) 3,7 (M)
Singh	1973-2008	EEUU	Melanoma uveal	4070	Clínicos	5,8 (H)
Aronow	1973-2013	EEUU	Melanoma Uveal	4999	Clínicos	4,4 (M)
EUROPA						
Mallone	1995-2002	Toda Europa	Melanoma Uveal	4097	Clínicos	5,1
Lensen	1943-1952	Dinamarca	Melanoma Uveal	305	Histológicos	7,4
Lommatzsch	1961-1980	Este Alemania	Melanoma ocular		Clínicos	10

Swerdlow	1962-1977	Inglaterra	Melanoma ocular	4284	Clínicos	7,2 (H) 5,7 (M)
Keenan	1999-2010	Inglaterra	Melanoma uveal		Clínicos	10
Raivio	1953-1973	Finlandia	Melanoma CC + Coroides	359	Histológicos	5,3
Teikari	1973-1980	Finlandia	Melanoma CC + Coroides	382	Clínicos	7,6
Vidal	1992	Francia	Melanoma uveal	412	Clínicos	7
Gislason	1955-1979	Islandia	Melanoma CC + Coroides	29	Histológicos	7,0 (H) 5,0 (M)
Mork	1953-1960	Noruega	Melanoma ocular	220	Histológicos	9
Bergman	1960-1998	Suecia	Melanoma uveal	2997	Clínicos	9,4 (H) 8,8 (M)
AUSTRALIA						
Kricker	1996-1998	Australia	Melanoma coroides	539	Clínicos	11,0 (H) 7,8 (M)
ASIA						
Iscovich	1961-1989	Israel	Melanoma CC + Coroides	502	Clínicos	5,7 (judíos) 2,9 (otros)
Kaneko	1977-1979	Japón	Melanoma uveal	82	Histológicos	0,3
Park	1999-2011	Corea del Sur	Melanoma uveal	326	Clínicos	0,42
Cheng	1979-1996	Taiwan	Melanoma ocular	128	Clínicos	0,39

Tabla 1: Artículos publicados acerca de la incidencia nacional del MU en distintos países. Tabla adaptada del libro Clinical Ophthalmic Oncology Uveal Tumors. Third Edition.2019[18].**CC: cuerpo ciliar; H: hombre; M: mujer.**

Por otro lado, en el Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) se informó de que, en función de la altura tumoral, la mortalidad de los pacientes con MU a los 5 años es del 16%, 32% y 53% para los MU de tamaño pequeño, mediano y grande, respectivamente.

Respecto a la mortalidad asociada a metástasis del MU, continúa siendo muy elevada. Hasta un 50% de los pacientes con MU, desarrollan enfermedad metastásica por implantación de las células tumorales fundamentalmente en el hígado (89%), el pulmón (29%) y más raramente en hueso (17%) y otros órganos[21]. La mortalidad de estos pacientes a los 10 años tras el diagnóstico de metástasis se sitúa, según el COMS, entre el 17-18% para los MU con tamaño mediano y en el 40-45% para los de tamaño grande[27].

Por todo ello, a pesar de que la mayor parte de las metástasis del MU se producen en los primeros 5 años después del tratamiento, el COMS ha estimado que la supervivencia global del MU metastásico se sitúa entre los 4 y los 15 meses[28]. No obstante, es necesario tener en cuenta que en la bibliografía se ha descrito la existencia de casos donde el intervalo de tiempo entre el tratamiento y el desarrollo de enfermedad metastásica era muy amplio, llegando a superar en ocasiones los 20 años. En concreto, Shields et al, describieron un caso en el cual la metástasis hepática aparecía 42 años más tarde del diagnóstico de un MU[29].

II. 2. FISIOPATOLOGÍA DEL MU

II. 2.1 ORIGEN Y TRANSFORMACIÓN DEL NEVUS OCULAR EN MU

El MU, constituye una neoplasia intraocular que deriva, generalmente, de una proliferación masiva de melanocitos del tracto uveal. A nivel embriológico, el origen del MU se sitúa en células derivadas de la cresta neural, tal y como ocurre en los melanomas cutáneos y de conjuntiva. No obstante, a pesar de su origen común con el melanoma maligno cutáneo (MMC), el MU se comporta clínica y molecularmente de manera muy diferente. En efecto, una de las principales diferencias radica en que a diferencia del MMC, metastatiza por vía hematógena[30,31].

Aunque se sabe que el MU se puede originar *de novo,* existen estudios que sugieren que la mayor parte de estos tumores se originan a partir de un nevus uveal preexistente[32-34]. Los nevus oculares son tumores melanocíticos benignos que pueden encontrarse en las distintas partes del tracto uveal; iris, coroides y cuerpo ciliar. Cada uno de estos tipos anatómicos de nevus presenta características propias que permiten diferenciarlos. Su prevalencia todavía no está muy clara, pero históricamente y en diferentes estudios clínicos, se ha estimado que se sitúa entre el 0,2 y el 30%[35,36].

En primer lugar, el nevus de iris constituye una lesión pigmentada benigna derivada de una proliferación sin evidencias de malignidad de los melanocitos del estroma. Su incidencia se ha relacionado con la neurofribromatosis[37].

Respecto al nevus de cuerpo ciliar, se trata de una entidad raramente diagnosticada, ya que debido a su localización anatómica son mucho menos evidentes a nivel clínico, siendo el cuerpo ciliar una parte del tracto uveal de difícil visualización mediante las distintas técnicas de exploración oftalmológica[38].

Finalmente, tal y como ocurre con el MU, el nevus de coroides es el más común de los tres tipos anatómicos[35,36,39] y es definido por el COMS como lesiones melanocíticas de menos de 5 mm de diámetro basal y menos de 1 mm de altura, aunque algunos autores elevan la altura hasta los 2 mm[32,40]. Actualmente, en la comunidad científica se han introducido los términos de Lesión Coroidea Melanocítica de Pequeño Tamaño (LCMPT) o Tumor Coroideo Pigmentario Pequeño,

para referirse a las lesiones coroideas de pequeño tamaño, es decir, con menos de 3 mm de altura, menos de 5 mm de diámetro basal y en las cuales puede existir una duda a nivel clínico acerca de su posible riesgo de crecimiento y malignidad[41].

A nivel clínico, los nevus de coroides son lesiones melanocíticas planas o mínimamente elevadas con márgenes que pueden estar difusos. La mayor parte de los nevus coroideos no incrementan su tamaño, pero en la literatura se han descrito casos en los cuales se ha visto crecimiento sin rasgos de malignidad asociados[42]. Algunos autores han documentado que la tasa de transformación de nevus coroideos en melanomas se sitúa en torno a 1 de cada 8845[40,42].

En los últimos años, se ha visto que el diagnóstico precoz de melanomas coroideos de pequeño tamaño aporta a los pacientes una mayor supervivencia global[34]. Siendo, en ocasiones, todo un reto el diagnóstico diferencial entre un nevus coroideo y un melanoma de pequeño tamaño. Shields et al. plantearon para el diagnóstico precoz de estos melanomas una serie de características que han de presentar las LCMPT para cumplir criterios diagnósticos de transformación a un melanoma coroideo y que sigue la regla mnemotécnica ***"To find small ocular melanoma using helpul hints daily"*** (Figura 1). En este estudio, se sugiere que la presencia de al menos tres de estas características en un mismo paciente aporta un 50% de probabilidades de transformación maligna. El riesgo se incrementa de manera progresiva a medida que aumenta el número de factores presentes. Pero, además, la combinación más grave de factores se da en aquellos pacientes con una altura tumoral superior a 2 mm, margen del tumor en el disco óptico y presencia de signos visuales, donde el riesgo de transformación maligna se eleva al 69%[43].

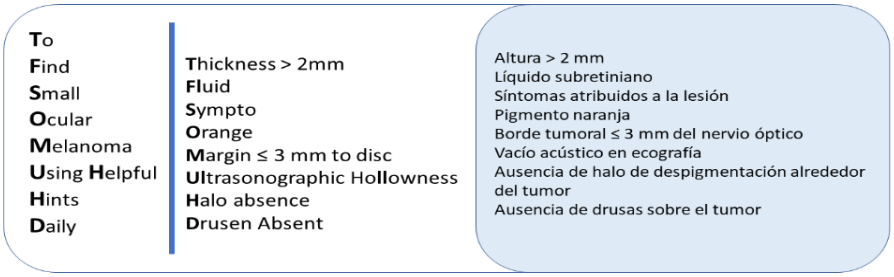


Figura 1: Descripción de las características clínicas necesarias descritas por Shields et al. para cumplir criterios de transformación de un nevus coroideo a un melanoma[43].

II. 2.2 CONSIDERACIONES ANATÓMICAS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El tracto uveal, es una capa anatómica intermedia del ojo que se localiza entre la esclera y la retina. Está vascularizada y pigmentada y se compone de tres partes fundamentales; iris, cuerpo ciliar y coroides[44] (Figura 2).

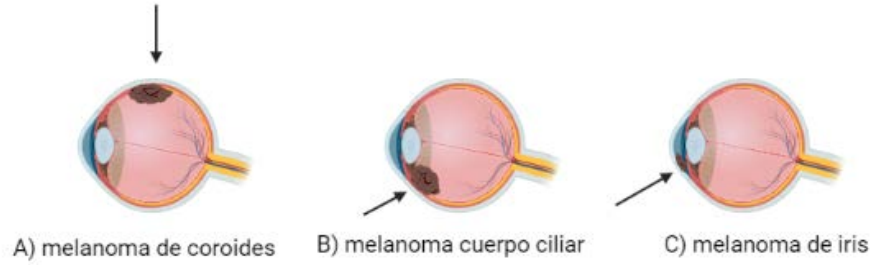


Figura 2: Figura representativa de la localización anatómica y apariencia clínica del MU en un corte sagital de un globo ocular. **A)** Melanoma coroideo, **B)** Melanoma de cuerpo ciliar, **C)** Melanoma de iris. (Imagen propia creada con BioRender.com[45]).

En el ojo, existen tres tipos de células pigmentadas; las células del epitelio pigmentario de la retina, los melanocitos conjuntivales y los melanocitos de la úvea, siendo estos últimos los que dan origen al MU[18,44]. Los melanocitos de la úvea, son células dendríticas que derivan de la cresta neural, muestran una pigmentación variada y que se distribuyen por el estroma del iris, cuerpo ciliar y coroides. Estas células, dispersas por todo el tracto, portan melanina en unas estructuras celulares denominadas melanosomas y, existen diferencias

interindividuales e interraciales en cuanto a la concentración y cantidad relativa de las mismas en las distintas partes de la úvea, hecho que aporta, por ejemplo, las diferencias en cuanto al color del iris[44].

Anatómicamente, se pueden distinguir, por tanto, tres tipos de melanomas uveales que se corresponden con las tres divisiones anatómicas de la úvea. A continuación, se describen brevemente, sus características anatómicas y clínicas.

II. 2.2.1 Melanoma de iris

Este melanoma se localiza en el iris, la parte más anterior del tracto uveal. El iris, es un diafragma más o menos pigmentado, que puede contraerse o dilatarse para regular la intensidad de luz que penetra en el ojo[44]. Este tipo de melanomas, constituye entre el 3-10% de todos los MU y su mortalidad es mucho menor que la observada en el caso de los melanomas de coroides y cuerpo ciliar[37], situándose en aproximadamente el 0-3% a los 5 años después del tratamiento[46]. Su pronóstico es relativamente bueno y puede asociarse, en parte, a que debido a su localización suelen diagnosticarse en estadios más tempranos de la enfermedad.

Los melanomas de iris, se desarrollan con mayor frecuencia en el cuadrante inferior de esta región, una zona más propensa a la aparición de nevus y donde la incidencia de la radiación ultravioleta es mayor que en otras partes del ojo[47,48]. Pueden presentarse como lesiones pequeñas, planas y de límites precisos hasta extensas, elevadas y de límites imprecisos[49]. Histológicamente, estos tumores se encuentran compuestos por células epitelioides y fusiformes[50].

Aunque se ha comentado que la incidencia de MU en individuos jóvenes es baja, este grupo poblacional presenta una frecuencia relativamente mayor de melanoma de iris (12-41%) que la población adulta con edades superiores a los 21 años (4-8%)[47,51] (Figura 3).

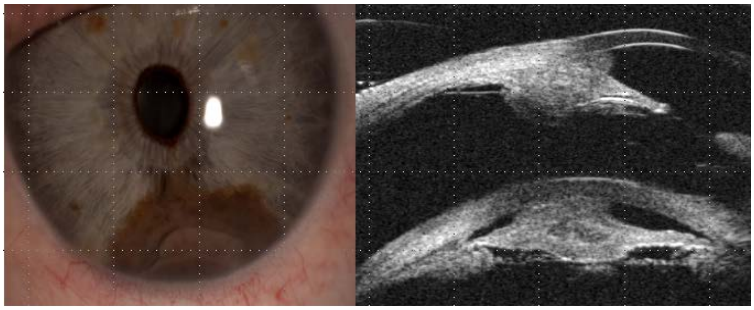


Figura 3: Foto de melanoma de iris y cuerpo ciliar e imágenes correspondientes a la biomicroscopía ultrasónica. (Imágenes cedidas por la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto; URQTIA-CHUS).

II. 2.2.2 Melanoma de cuerpo ciliar

Los melanomas de cuerpo ciliar, suponen aproximadamente el 10% de todos los MU[38] y son más comunes que los de iris pero menos que los de coroides. Uno de los principales problemas de este tipo de melanomas consiste en que, generalmente, son diagnosticados de manera tardía, pues inicialmente son asintomáticos y su localización dificulta su hallazgo. Pueden llegar a alcanzar un gran tamaño, pero incluso cuando este es significativo, en ocasiones resulta complicado su diagnóstico mediante las principales técnicas oftalmoscópicas[18,52].

Entre los signos clínicos de un melanoma de cuerpo ciliar se incluye el desarrollo de cataratas sectoriales o totales, vasos epiesclerales dilatados, hemorragias vítreas o glaucoma neovascular[38,52]. Además, una masa en el cuerpo ciliar puede provocar la inclinación del cristalino o su desplazamiento anterior, lo que puede dar lugar a un astigmatismo incorregible[52].

Por otro lado, el melanoma de cuerpo ciliar, puede expandirse hacia el ángulo de la cámara anterior y el iris (melanoma iridociliar), o hacia la parte posterior e invadir el coroides (melanoma ciliocoroideo)[18]. En raras ocasiones, el melanoma de cuerpo ciliar puede aparecer como un "melanoma en anillo", es decir, con una extensión circunferencial de 180-360º del cuerpo ciliar, y en este caso presentan un riesgo mucho mayor de expansión extraescleral y metástasis[38] (Figura 3).

II. 2.2.3 Melanoma de coroides

Los melanomas de coroides, suponen aproximadamente el 80% de la prevalencia del MU[53]. Este tipo de melanomas pueden adquirir diferentes aspectos, desde amelanóticos a fuertemente pigmentados. El grado de pigmentación que presenta el tumor es independiente del tipo celular.

Normalmente, se trata de lesiones elevadas y con forma de cúpula (80% de los casos) o en forma de champiñón (20% de los casos), pero también pueden presentarse de manera difusa o incluso ser lobulares[18,50,52,54]. La aparición de la típica morfología en champiñón, se produce cuando crecen dando lugar a una masa discoidal mayor o cupuliforme, provocando la compresión de la membrana de Bruch que finalmente acaba rompiéndose. Consecuentemente, el tumor se hernia en el momento inicial a través de la ruptura y continúa creciendo dentro del espacio subretiniano, donde su crecimiento suele ser mayor que en el coroides y es entonces cuando comienza a adquirir forma de champiñón, una conformación altamente característica del melanoma de coroides[18,50].

Los melanomas coroideos intensamente melanóticos y pequeños, exhiben en su superficie pigmento naranja que se corresponde con la presencia de gránulos de lipofuscina asociado con fluido subretiniano[52]. Como vimos, dicho pigmento puede estar presente en la superficie de los nevus coroideos y constituye un signo de su transformación maligna[43].

En ocasiones, los pacientes pueden permanecer asintomáticos (aproximadamente el 10% de los casos) y ser diagnosticados de manera accidental en revisiones rutinarias. Generalmente, esto es debido a que presentan tumores de pequeño-mediano tamaño localizados alrededor del ecuador[18]. Los síntomas que pueden aparecer no son específicos, siendo múltiples y presentándose, a menudo, de manera secuencial. Algunos de ellos pueden ser la micropsia o distorsión visual, cuando se localizan a nivel de la mácula[52], el desprendimiento de retina exudativo, neovascularización coroidea, hemorragias vítreas o glaucoma secundario, entre otros[18].

Existe una variante rara del melanoma de coroides, conocida como melanoma difuso, que constituye una forma más agresiva de tumor, más

invasivos y con mayor tendencia a la extensión extraocular[18,52] (Figura 4). Se caracterizan por ser una forma infiltrante de un tumor plano o ligeramente elevado con márgenes irregulares y pigmentación heterogénea, que tiende a rodear el disco óptico y que puede producir glaucoma cuando invade la región anterior[18].

Según el COMS y estudios previos, los melanomas de coroides pueden clasificarse de acuerdo a su diámetro basal y altura en pequeños, medianos y grandes (Tabla 2).

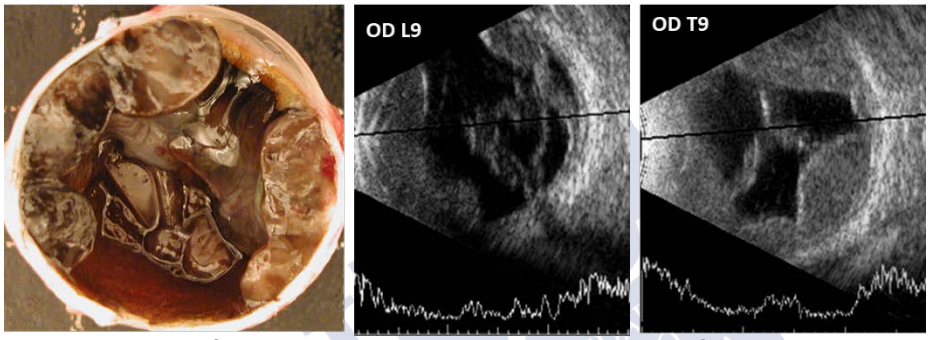


Figura 4: Fotografía de melanoma de coroides con exploración difusa, muy mal pronóstico, en corte de globo ocular enucleado y correspondientes imágenes de la ecografía ocular a la derecha (Imágenes cedidas por la URQTIA-CHUS).

Estudio	MU PEQUEÑO	MU MEDIANO	MU GRANDE
COMS	1,5-2,4mm de altura y 5-16 mm diámetro	2,5-10mm altura apical y ≤16 mm diámetro	>10 mm altura apical y >16 mm diámetro

Tabla 2: Clasificación por tamaños del melanoma de coroides. Criterios de clasificación por tamaño propuestos por el COMS.

II. 3. FACTORES DEL RIESGO

El MU es una de origen espontáneo y aunque se conoce muy poco acerca de su etiología, se han descrito algunos factores que incrementan el riesgo de desarrollar este tipo de neoplasias. Los principales recogidos a partir de la bibliografía más actualizada y reconocida en el estudio del MU, se describen a continuación.

II. 3.1 ORIGEN ÉTNICO

Dentro de los factores de riesgo asociados a esta patología, se describe el origen étnico de los pacientes como uno de los principales. Así, en individuos caucásicos de origen no-hispano, el riesgo relativo de desarrollar esta patología es mucho mayor que el de caucásicos hispanos, asiáticos y pacientes de raza negra[5].

Un estudio publicado por Hu DN y col. en el año 2008, demostró la existencia de una incidencia unas 6 veces mayor de MU en individuos con ascendencia de países del norte de Europa que en aquellos procedentes del sur de este mismo continente[55].

II. 3.2 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y OTROS FACTORES AMBIENTALES

Algunas investigaciones han sugerido que, a diferencia de lo que ocurre en el desarrollo del MMC y otros tipos de cáncer de piel, en el MU la relación entre la exposición a radiación ultravioleta (UV) y el riesgo de desarrollar este tipo de tumores es muy controvertida[56].

Por un lado, algunos estudios sugieren que no existe una relación clara entre el padecimiento de un MU y la exposición frente a radiación ultravioleta[57]. Otros sugieren un ligero incremento en el riesgo frente a MU en ocupaciones desarrolladas al aire libre frente a otras llevadas a cabo en ambientes interiores, e incluso en individuos expuestos al uso de lámparas solares[58-60].

Asimismo, se publicaron estudios en los cuales se define la existencia de un mayor riesgo de desarrollar un MU en pacientes con iris de tonalidad clara expuestos a una elevada radiación UV, siendo una certeza que, en su mayoría, los melanomas de iris afectan a pacientes con iris de pigmentación clara[61-63].

Por otro lado, estudios epidemiológicos han sugerido que la soldadura con arco eléctrico podría suponer un riesgo incrementado de

desarrollar un MU, riesgo que podría derivar de una exposición combinada a la radiación visible e infrarroja junto con otros factores de riesgo potenciales como la exposición a determinados químicos[48]. De hecho, se ha visto que ciertos agentes químicos como los formaldehídos, el amianto, los anticongelantes o los pesticidas, podrían incrementar el riesgo[64].

En otros estudios se ha barajado la exposición frente a otros agentes como los campos electromagnéticos, las hormonas artificiales, el tabaco o los teléfonos móviles sin encontrarse correlación epidemiológica con el MU[65,66]. Por otro lado, otros trabajos han revelado una significativa incidencia de MU en cocineros[67,68], electricistas y trabajadores de interior como científicos, jueces o profesores[56].

II. 3.3 ASOCIACIONES FENOTÍPICAS

II. 3.3.1 Melanocitosis

Se ha descrito una mayor predisposición a desarrollar MU en los pacientes afectados de *melanosis oculi* o melanocitosis oculodérmica (Nevus de Ota), patologías caracterizadas por una hiperpigmentación de la esclera en el caso de la primera y la afectación de la piel peri-orbitaria y el párpado en la segunda, aumentado el riesgo de desarrollar un MU en comparación con la población general sana[69]. Algunos autores consideran que la cantidad de melanocitos presentes en el tracto uveal de estos pacientes podría ser la base biológica para el desarrollo del MU, melanocitos que según ciertos estudios genéticos podrían presentar mutaciones en el gen *GNAQ* que explicarían el desarrollo de este tipo de neoplasias intraoculares[70].

II. 3.3.2 Síndromes asociados

Se ha considerado que ciertos síndromes como el nevus displásico, el síndrome de melanoma familiar atípico con molas múltiples o la neurofibromatosis tipo I, podrían conferir un riesgo incrementado de padecer un MU.

En el caso de los dos primeros síndromes, dicha afirmación se sustentaría en la relación que se ha establecido entre la presencia de un MU y el nevus atípico cutáneo, el nevus cutáneo común, la presencia de pecas cutáneas y el nevus de iris[71-73]. Y debido a que los melanocitos

cutáneos y uveales comparten propiedades embriológicas y morfológicas similares, es posible que dentro del espectro de estas afecciones pueda acentuarse el riesgo de desarrollar un MU[73,74].

En el caso de la neurofibromatosis tipo 1, la correlación entre una y otra patología se basa en que tanto las células que dan lugar al MU como las afectadas en el caso de la neurofibromatosis proceden de la cresta neural[74,75]. Sin embargo, actualmente, la relación entre ambas patologías presenta cierta controversia y algunos autores consideran que la coexistencia de ambas patologías podría deberse a una coincidencia y no a una predisposición común[76].

II. 3.3.3 Predisposición genética

Otra de las relaciones que se han establecido en cuanto a la predisposición frente al MU, es la posible existencia de una predisposición genética basada, fundamentalmente, en la descripción de la existencia de casos familiares de MU (MUF), formas bilaterales o multifocales, formas juveniles y, muy raramente, formas congénitas[18].

En familias afectadas de MU se ha descrito la existencia de mutaciones germinales en el gen que codifica para la proteína-1 asociada a BRCA1 (*BAP1*)[77-79]. Realmente, hasta la fecha, sólo un pequeño número de estudios se han centrado en la búsqueda de factores genéticos de riesgo frente al MU, pero en ellos se han identificado *loci* de bajo y alto riesgo que deben ser considerados en el estudio de pacientes con MU.

Respecto a los *loci* asociados con bajo riesgo, en un estudio llevado a cabo sobre 272 pacientes afectados de MU y 1 782 controles, se estudiaron una serie de polimorfismos de nucleótido único (del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) que mostraban relación con el desarrollo del MMC, observándose una asociación significativa entre la presencia de ciertos polimorfismos en los genes de pigmentación *HER2*, *IRF4* y *OCA2* y el riesgo de desarrollar un MU[80].

Por otro lado, un estudio de asociación de genoma completo (del inglés, Genome Wide Association Study; GWAS), reveló la existencia de polimorfismos de asociación localizados en el cromosoma 5p15.33, donde se ubicarían los genes *TERT* y *CLPTM1L*[81].

Finalmente, en cuanto a los genes asociados a riesgo elevado, muy recientemente, en el año 2020, se publicaron tres estudios en los cuales se sugiere que la presencia de variantes germinales en los genes *PALB2, MLH1, SMARCE1, MDB4* y *POT1,* confieren predisposición genética frente al desarrollo de un MU[82-84]. Asimismo, se ha publicado la asociación de mutaciones en otros genes con casos puntuales de MU. Pero, a pesar de todo ello, el único gen que, por el momento, sigue mostrando una asociación definitiva con el desarrollo de un MU es *BAP1*[50]. Este punto se tratará con mayor detenimiento en el capítulo 1 de esta tesis doctoral.

II. 4. DIAGNÓSTICO, SEGUIMIENTO Y PREVENCIÓN

II. 4.1 SIGNOS Y SÍNTOMAS DEL MU

Los pacientes que desarrollan un MU, pueden permanecer asintomáticos durante mucho tiempo y desarrollar los primeros síntomas cuando el tumor ya se encuentra desarrollado de manera significativa[50,85]. Aquellos tumores que muestran una localización más anterior, requieren un período más largo antes del comienzo de los primeros síntomas[54]. De hecho, en un estudio llevado a cabo en el Centro de Oncología Ocular de Liverpool entre los años 1996 y 2011 se vio que, de 2 384 pacientes diagnosticados de MU, un tercio eran asintomáticos en el momento del diagnóstico[86].

Dentro de los primeros síntomas que suelen aparecer, se encuentra la pérdida de agudeza visual indolora o alteraciones visuales como metamorfopsias, pero los tumores grandes pueden asociarse también con desprendimientos serosos de retina o fotopsias[50,85].

En el caso de los melanomas de iris, por lo general, se caracterizan clínicamente por la existencia de una prominente vascularización, ectropión extenso, glaucoma secundario, cataratas sectoriales, crecimiento y extensión extraescleral; características que permiten distinguirlos de los nevus[85,87]. Además, ocasionalmente, pueden ser percibidos por el paciente como una heterocromía. Mientras que los melanomas de cuerpo ciliar, pueden conducir a astigmatismo por desplazamiento de la lente ocular o del cristalino[85].

El diagnóstico diferencial de un MU, incluye descartar varias condiciones que, en ocasiones, pueden simular un MU de coroides, siendo la más común la presencia de un nevus coroideo benigno, pero donde también se incluyen la degeneración macular asociada con la edad, la hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina, las metástasis coroideas y el hemangioma coroideo circunscrito[88].

II. 4.2 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS Y EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA

Para el diagnóstico de un MU, es recomendable que los pacientes con sospecha de padecer este tumor sean valorados tanto por oftalmólogos como por expertos en oncología ocular. Existen varias técnicas de imagen que pueden ser empleadas para el diagnóstico de un MU, pero las principales que permiten diagnosticar cerca de un 99,7% de los tumores, son la ecografía ocular y la oftalmoscopía indirecta, especialmente en el caso de los melanomas de coroides de tamaño mediano/grande, en los cuales la ecografía resulta de gran utilidad[89].

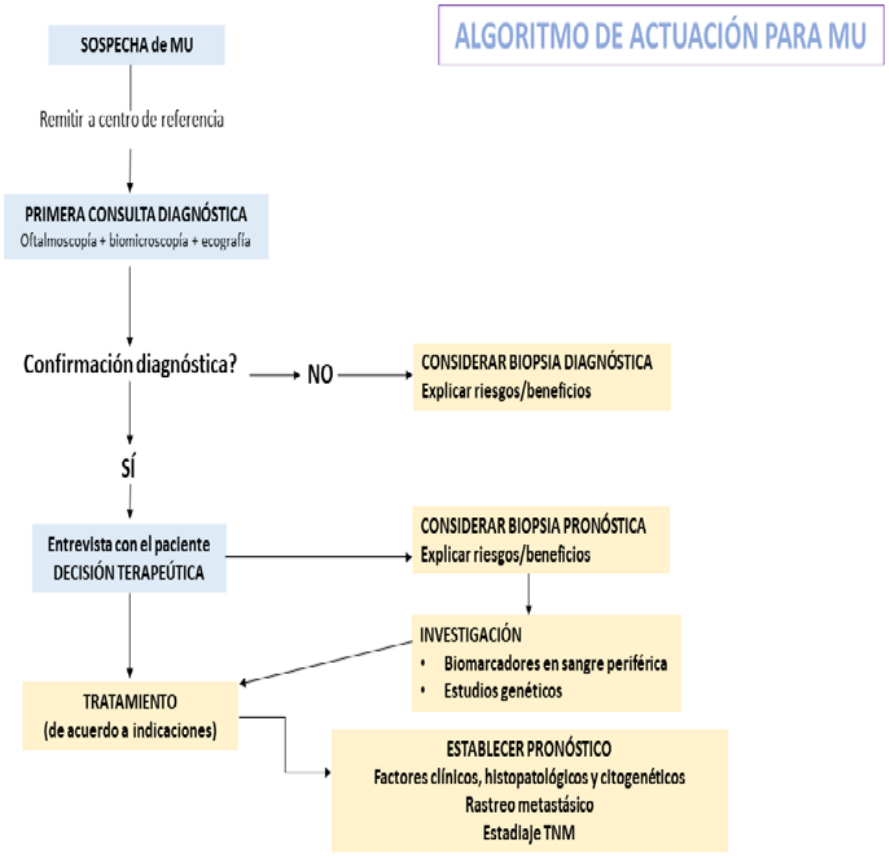
Hay varios estudios que han demostrado que la ecografía ocular es una de las técnicas de imagen más empleadas en el diagnóstico del MU, y en el seguimiento de los casos sometidos a tratamientos locales conservadores[90]. Normalmente, este tipo de tumores revelan en la ecografía ocular su característica forma de "champiñón"[85].

En contraposición a lo que ocurre con otros tipos de tumores, en el diagnóstico del MU no se utilizan por rutina técnicas histológicas o citológicas[91]. De hecho, constituye uno de los pocos tipos de cáncer en los cuales no es estrictamente necesario recurrir a la biopsia con fines diagnósticos. Las indicaciones específicas para recurrir a esta técnica en el proceso diagnóstico radicarían, únicamente, en casos en los que exista una duda diagnóstica formulada por un experto en oncología ocular, en el caso de que exista una sospecha de una metástasis ocular en un paciente donde no haya historia clínica de otro tipo de cáncer extraocular o metástasis confirmadas anatomo-patológicamente o una petición expresa del paciente para confirmación patológica del diagnóstico antes de ser sometido al tratamiento recomendado. Esta técnica puede resultar especialmente útil en el caso de tumores amelanóticos o cuando la ecografía ocular no define con total exactitud el diagnóstico de MU[50,85].

Cabe mencionar que el verdadero reto diagnóstico lo ofrecen los MU de pequeño tamaño y, por tanto, la detección precoz de un MU. Para determinar el diagnóstico de un MU de pequeño tamaño, en ocasiones es necesario detectar alguno de los factores de riesgo que conducen a la transformación de un nevus benigno en un MU[85,91].

En la imagen adjunta a continuación, se muestra el esquema del algoritmo de actuación a seguir en una unidad de oncología ocular ante el diagnóstico de un MU propuesto en la Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Española de Retina y Vítreo 19 [49] (Figura 5).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



PRONÓSTICO:
Factores clínicos: edad, tamaño, localización, afectación de cuerpo ciliar, extensión extraocular
Factores histopatológicos (si especímen): tipo celular, actividad mitótica, (ki-67/Mib-1 y PCNA), patrón vascular en red, infiltración linfocitaria, extensión extraocular.
Factores citogenéticos (si especímen): monosomía 3, polisomía 8, perfiles de expresión génica.
Rastreo metastásico: ECO abdominal VS TC tóraco-abdominal, bioquímica hepática y CEA.
Estadiaje TNM

Figura 5: Algoritmo de actuación ante el diagnóstico de un MU adaptado de la Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Española de Retina y Vítreo 19. Melanoma Uveal[49].

II. 5. METÁSTASIS

Sólo el 1% de los pacientes muestra enfermedad metastásica clínicamente evidente en el momento de presentación inicial del MU[92]. No obstante, aproximadamente el 50% acaban desarrollando metástasis, a pesar de que el tratamiento local del tumor resulte exitoso, y su aparición constituye la principal causa de muerte en los mismos[50,93,94]. De hecho, el seguimiento a largo plazo de pacientes con MU tratados, reveló que el 31% de los casos desarrollaron metástasis a los 5 años, el 45% a los 15 años y el 50% a los 25 años[93]. De acuerdo con estos datos, se ha sugerido que es probable que en el momento del diagnóstico, algunos pacientes presenten metástasis subclínicas[18].

En cuanto a la supervivencia media de estos pacientes, se ha sugerido que se sitúa en torno a los 3 a 10 meses[95,96]. En concreto, en un estudio publicado por Lane A. et al en el año 2018[97], los autores concluyen que sus hallazgos indican que a lo largo de las últimas décadas no se ha producido un avance real en cuanto a tratamientos que conduzcan a mejoras clínicamente significativas en los tiempos de la supervivencia de los pacientes con MU metastásico, ya que, en su análisis observaron una tasa de supervivencia media similar a la que previamente había sido publicada por el mismo grupo en 1991[96]. Asimismo, sugieren que la forma más eficaz de mejorar la supervivencia de los pacientes con MU metastásico puede ser la administración de terapias adyuvantes en el momento del diagnóstico[97]. En contraposición, otros estudios sitúan la supervivencia media en cifras más próximas a los 20 meses[98,99].

Debido a la ausencia de vasos linfáticos intraoculares, la extensión del MU por vía linfática es muy rara y este tumor se caracteriza por su diseminación por vía hematógena[100]. Aunque, en algunos casos se ha descrito la presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales después de la extensión local del tumor a la conjuntiva, donde las células del MU sí pueden alcanzar los vasos linfáticos[101].

Otra de las principales características de los MU metastásicos, es que el órgano diana preferente de las lesiones metastásicas (70-90% de los casos) es el hígado[18,50,100]. También se ha descrito metástasis por MU en otras localizaciones como pulmón, hueso, piel o tejido subcutáneo, aunque generalmente tienen lugar tras previa invasión del

tejido hepático[102]. Pero en aproximadamente el 40% de los pacientes con metástasis, el hígado es el único órgano afectado[103].

Actualmente, todavía se desconoce la causa del elevado tropismo que muestra el MU por el hígado en la fase de diseminación de la enfermedad, que sugiere la hipótesis de la necesidad de la existencia de un nicho hepático, que predisponga a la implantación de las células cancerosas procedentes del MU en este órgano. Numerosas investigaciones sobre las vías moleculares de la metástasis hepática en pacientes con MU, han sugerido que podría explicarse en base al eje receptor-ligando de quimioquinas[104,105].

Los pacientes con metástasis pueden presentar una amplia variedad de signos y síntomas en función del órgano que se vea afectado, pero alrededor del 60% se muestran asintomáticos en el momento de detección de la enfermedad metastásica[106]. Aun así, el papel del cribado sistémico es controvertido en base a la ausencia de un tratamiento con eficacia demostrada para la enfermedad metastásica. Se han propuesto varios protocolos posibles de cribado, el propuesto por el COMS, sugiere que los pacientes con melanomas de tamaño mediano y grande sean sometidos anualmente al rastreo para enfermedad metastásica, lo cual implica el examen físico, radiografía de tórax y test de funcionalidad hepática[92]. Sin embargo, incluso en individuos correctamente sometidos al cribado, no parece haber cambios en cuanto a la supervivencia de los individuos entre los casos que son diagnosticados tras la manifestación de síntomas y aquellos que se detectan mediante el cribado metastásico[107]. Pero, hay estudios que sugieren que un cribado llevado a cabo únicamente mediante estudios de imagen del hígado, cada 6-12 meses, puede ser adecuado para detectar el melanoma metastásico en estadio subclínico[106].

II. 6. FACTORES PRONÓSTICO

A lo largo de los años se han propuesto varios factores clínicos, anatomo-patológicos y moleculares que parecen guardar relación con el riesgo de desarrollo de enfermedad metastásica en los pacientes afectados de MU y, por tanto, en la supervivencia de los mismos.

Para comprender la biología de los procesos neoplásicos, resulta de vital importancia la identificación y evaluación de factores pronóstico, ya que, permiten predecir la evolución clínica de los pacientes, llevar a cabo una estratificación en cuanto a riesgo de los mismos, la posibilidad de adaptar los tratamientos, así como identificar a pacientes con riesgo potencial de recidiva[108]. En este apartado se detallan los factores pronóstico más aceptados, a día de hoy, por la comunidad científica en el MU (Figura 6).

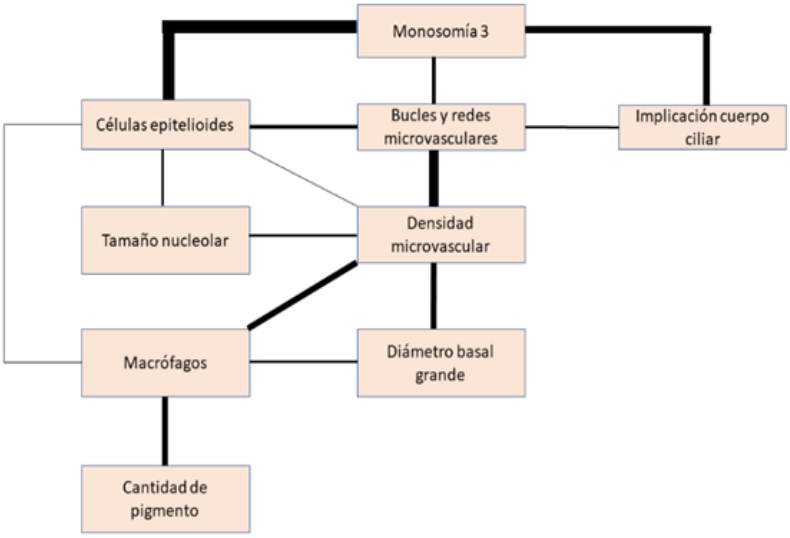


Figura 6: Esquema representativo de las asociaciones entre distintos factores con valor pronóstico en el MU. Cuanto más gruesa la línea de conexión, mayor es la asociación (Figura adaptada del libro Clinical Ophthalmic Oncology, Uveal Tumors. Third Edition. 2019[18]).

II. 6.1 FACTORES CLÍNICOS

II. 6.1.1 Edad de presentación y sexo

Existen estudios en los cuales se ha podido demostrar que el pronóstico de los pacientes con MU es mejor en individuos jóvenes que en individuos de edad avanzada, por lo que la edad en el momento del diagnóstico parece guardar relación con la evolución clínica de la enfermedad. En algunos de ellos, pudo demostrarse que la presencia de metástasis en niños con MU es poco frecuente y que el pronóstico de vida es más favorable que en adultos. Algunos autores han especulado que el pronóstico favorable podría radicar en una incidencia más elevada de melanoma de iris en edades tempranas, en un menor tamaño de los tumores y en la ausencia de extensión extraescleral en el momento del diagnóstico, factores todos ellos asociados, a su vez, con un mejor pronóstico[51].

En una investigación retrospectiva llevada a cabo por Shields et al. en una cohorte de 8 033 pacientes, se vio que la supervivencia a los diez años relacionadas con el tumor en pacientes de edad joven o adultos de mediana edad en comparación con los adultos de edad avanzada, era menor. Asimismo, observaron que el tamaño basal del tumor y el riesgo de metástasis eran menores en individuos jóvenes[109].

Por otro lado, Kaliki et al. llevaron a cabo un estudio retrospectivo donde se estudiaba el efecto de la edad en la supervivencia en paralelo en una cohorte de 122 pacientes jóvenes (<20 años), 122 adultos de edad media (21-60 años) y 122 adultos mayores (>60 años). Se vio que las tasas de supervivencia a los cinco, diez y quince años era mayores en los pacientes jóvenes (1%, 8% y 8%) y en los pacientes de edad intermedia (5%, 11% y 26%), en comparación con los adultos mayores (13%, 16% y 24%). Además, para evitar sesgos provocados por el efecto de otras características clínicas con valor pronóstico, se descartaron los pacientes con melanomas de iris y, aun así, pudo comprobarse que los pacientes jóvenes y de edad intermedia mostraban tasas de supervivencia mayores que los de edad avanzada[15].

Con respecto al sexo del paciente, algunos estudios sugieren una mayor tasa de metástasis en el sexo masculino[22,107], a pesar de que la COMS no observó diferencias en cuanto a la mortalidad entre ambos sexos[110]. Se han propuesto varias explicaciones para tratar de entender

las diferencias en cuanto a pronóstico asociadas al sexo, algunas basadas en el posible efecto de las distintas hormonas sexuales sobre la evolución del tumor. No se conocen estudios de los niveles de testosterona y su relación con el MU, pero algunos autores han sugerido que las diferencias observadas en cuanto a supervivencia entre ambos sexos, podrían deberse a la presencia de receptores para testosterona en el MU que darían lugar a un peor pronóstico en los hombres o, en su defecto, a que los estrógenos femeninos influyesen indirectamente en el tejido a través de la regulación de otros factores que afectasen de manera directa al melanoma. Así, en base a estas teorías, para algunos investigadores, la hipótesis más acertada se basaría en que los estrógenos podrían ejercer una acción inhibitoria en el crecimiento de micrometástasis en el hígado[22].

II. 6.1.2 Tamaño del tumor

El tamaño tumoral, es decir, el mayor diámetro basal y la altura, ha sido y continúa siendo una de las características clínicas con valor pronóstico más importantes a tener en cuenta en el seguimiento de pacientes con MU[107,111].

En un estudio retrospectivo llevado a cabo por Shields et al. en una cohorte de 8 033 pacientes de MU, estos autores determinaron la tasa de metástasis en base al grosor tumoral, análisis que puso de manifiesto que esta característica era un importante factor predictivo de metástasis. De hecho, fueron capaces de concluir que por cada milímetro adicional de altura el riesgo de metástasis se incrementaba en un 5% a los diez años[111].

El tamaño tumoral se puede definir mediante los criterios establecidos por el COMS, que considera tumores pequeños aquellos con una altura máxima de ≤2,5 mm y una base máxima ≤ 16 mm y grandes lo que tienen una altura máxima de > 10 mm o una base máxima de > 16 mm[110,112]. En el estudio llevado a cabo por el COMS, los tumores de tamaño mediano (3,1-8 mm de altura y <16 mm de diámetro basal) mostraron una mortalidad los 5 y 10 años del 19% y el 35%[110].

Por otro lado, cabe considerar que la última clasificación realizada por *The American Joint Committee on Cancer* (AJCC) defiende que el pronóstico desfavorable en el MU se fundamenta en el diámetro basal y el espesor del tumor y establece cuatro categorías, siendo el riesgo de metástasis a 10 años de un 6% en T1, 20% en T2, 32% en T3 y 63% en T4[113,114].

En definitiva, el tamaño tumoral es un importante factor pronóstico en los pacientes con MU y su evaluación es crucial para la selección del tratamiento que será aplicado. Por lo que, independientemente de la clasificación empleada (COMS o AJCC), el pronóstico del paciente es más desfavorable a medida que se incrementa el tamaño tumoral[110,114].

II. 6.1.3 Localización intraocular

Otra de las características clínicas y anatómicas que juega un papel importante en el pronóstico de los pacientes con MU, es la localización del tumor (iris, coroides o cuerpo ciliar). Tal y como se mencionó con anterioridad, los melanomas de iris se asocian al mejor pronóstico posible de la enfermedad, mientras que los de cuerpo ciliar al peor[115]. Así, el melanoma de iris, se asocia con una mortalidad mucho más baja que los melanomas de cuerpo ciliar y coroides, hecho que podría deberse, en parte, a que estos tumores son visibles y por ello relativamente pequeños en el momento del diagnóstico[47,87,116] y a que, mayoritariamente, muestran células de tipo fusiforme menos agresivas que el tipo epitelial[47].

En el año 2001, Shields et al. llevaron a cabo un estudio retrospectivo en 169 pacientes afectados de melanoma de iris con el fin de identificar los factores de riesgo metastásico y apreciaron que las metástasis ocurrían en el 3% de los casos a los cinco años, en el 5% a los diez años y en el 10% a los veinte años[117]. Posteriormente, este mismo grupo de autores determinó la tasa de metástasis en una cohorte de 8 033 pacientes y vieron que en los 285 casos de melanoma de iris, la tasa de metástasis a los diez años se situaba en torno al 7%, una tasa cinco veces menor que la obtenida para los casos de cuerpo ciliar (33,4%) y coroides (25%)[111].

Por otro lado, el mal pronóstico del melanoma de cuerpo ciliar se ha asociado a que, generalmente, se trata de tumores de mayor tamaño

con mayor frecuencia de alteraciones citogenéticas asociadas a mal pronóstico (monosomía 3) y con ciertos patrones microvasculares[38,115].

Rummelt et al. publicaron en un estudio que el peor pronóstico de los tumores de cuerpo ciliar podría explicarse por la tendencia de éstos a presentar redes y asas microvasculares. La presencia de una mayor vascularización también podría explicar el mayor tamaño de los melanomas del cuerpo ciliar[118]. Esto puede ser explicado en base a que normalmente los tumores de cuerpo ciliar son más difíciles de diagnosticar por su localización, lo que conlleva a su mayor desarrollo antes de la fase diagnóstico. Aunque, en algunos estudios se ha visto que estadísticamente el pronóstico resulta peor independientemente del tamaño y tipo celular de la neoplasia[119].

En cuanto a los melanomas de coroides, el pronóstico es intermedio entre los que implican al iris o al cuerpo ciliar[54,120].

II. 6.1.4 Extensión extraescleral

La extensión extraescleral del MU constituye un factor de mal pronóstico y se ha estimado que ocurre en aproximadamente un 8-15% de los casos[121,122]. Esta característica se asocia a tumores de gran tamaño, extensión tumoral anterior, gran diámetro basal, melanoma uveal difuso, tipo celular epitelioide, elevado índice mitótico, presencia de monosomía del cromosoma 3 y determinados patrones microvasculares[21].

En un estudio de 610 pacientes con MU, se vio que la tasa de mortalidad a los 5 años para los pacientes con una extensión microscópica y una extensión extraocular pequeña (1-4 mm) fue del 37 y del 48%, respectivamente. Cifras que además fueron especialmente significativas en el caso de los pacientes con gran extensión extraocular con una tasa de mortalidad del 78% a los 5 años[123].

II. 6.1.5 Melanocitosis ocular/oculodérmica

Como ya vimos, la melanocitosis ocular u oculodérmica se asocia con un riesgo incrementado de desarrollar un MU[69,124]. Recientemente se ha estudiado el papel de esta condición en el pronóstico de la enfermedad y se vio que podría existir una asociación de la melanocitosis ocular con un peor pronóstico del MU. De hecho, la

metástasis en pacientes con melanocitosis ocular *versus* a los no afectados por esta condición fue del 27% frente al 15% a los 5 años, y un 48% frente al 24% a los 10 años[125].

II. 6.2 FACTORES HISTOPATOLÓGICOS

Mediante el estudio de piezas tumorales enucleadas se pudo determinar que ciertos aspectos histopatológicos como el tipo celular, el índice mitótico, la densidad de microvascularización o el infiltrado celular no neoplásico, tenían valor pronóstico en MU.

II. 6.2.1 Tipo celular

El tipo celular del MU se ha descrito como un importante factor pronóstico en el MU. Históricamente se ha seguido la clasificación propuesta por Callender et al. donde se incluían tumores de tipo fusiforme A, fusiforme B, epitelioide, mixto, fascicular y tumores mixtos. Posteriormente, esta clasificación fue modificada para incluir las variantes fusiforme A, fusiforme B, epitelioide y los tumores mixtos. Es decir, los tumores clasificados como de células mixtas se subdividieron en grupos según el porcentaje y el tamaño de células epitelioides. De manera que los tumores anteriormente clasificados como de tipo fusiforme que contenían células epitelioides pequeñas o poco frecuentes se reclasificaron como de tipo celular mixto[126].

En un estudio reciente, donde se comparó la clasificación inicial con las modificaciones posteriores, se vio que la nueva clasificación mejoró la capacidad de predicción pronóstica para el paciente y, además se propuso que el tamaño nucleolar y el pleomorfismo son variables importantes a tener en cuenta y que deben considerarse en la clasificación de los MU[127]. Dentro de estos grupos, se vio que los tumores constituidos por células fusiformes se asocian a un pronóstico más favorable, los de tipo epitelioide a un pronóstico malo y los tumores de tipo mixto a un pronóstico intermedio[127].

II. 6.2.2 Actividad mitótica

Otro de los indicadores histopatológicos con valor pronóstico considerados es el índice o actividad mitótica de los tumores. Se ha visto que los tumores con una elevada proliferación celular tienen un peor pronóstico de la enfermedad[128]. Diferentes estudios han demostrado que elevados niveles de los marcadores de proliferación celular Ki-67 y PC-10 en células del MU se asocian con disminución en la supervivencia de los pacientes[129,130].

II. 6.2.3 Densidad de microvascularización

La densidad microvascular es una medida cuantitativa de la vascularidad tumoral. Se sabe que el crecimiento y extensión de un tumor dependen en gran medida de un adecuado aporte sanguíneo y, por ello, de una adecuada vascularización. Se ha descrito que existe una asociación significativa entre la densidad de microvascularización, la presencia de bucles y redes microvasculares, células epitelioides y diámetros tumorales basales elevados, características que influyen, todas ellas, en un mal pronóstico[131]. Otros estudios han demostrado que la arquitectura de la microcirculación, es decir, los patrones vasculares, constituye un importante predictor de muerte metastásica, estando la presencia de redes vasculares relacionada con una disminución de la supervivencia[132].

II. 6.2.4 Infiltración tumoral; linfocitos y macrófagos

Aproximadamente un 10% de los MU muestra cierto grado de infiltrado linfocitario. El aumento del número de linfocitos, se ha asociado con un pronóstico nefasto de la enfermedad[133,134]. En un estudio publicado en 2012, se vio que existía una relación directa entre los tumores con monosomía 3 y el influjo de linfocitos infiltrantes. Los MU que carecen de una copia del cromosoma 3 tienen la capacidad para producir mediadores inflamatorios que actúan activando a las células CD4+ y CD8+. La activación de estas células genera un microambiente inflamatorio que favorece la progresión del MU[134]. Asimismo, la presencia de un elevado número de macrófagos en el MU se asocia con un pronóstico desfavorable de la patología[135,136].

II. 6.3 FACTORES MOLECULARES Y GENÉTICOS

En las últimas décadas se ha visto que el pronóstico de los pacientes con MU también está muy relacionado con determinados factores moleculares. De manera progresiva se han ido conociendo las distintas rutas de señalización implicadas en el desarrollo y progresión de este tumor. Y se ha podido conocer que diferentes biomarcadores proteicos, alteraciones genéticas y epigenéticas están presentes durante la transición que se produce desde un melanoblasto hasta un MU, explicando la transformación maligna y la progresión metastásica de la enfermedad en algunos casos.

Aunque este apartado será objeto de estudio en profundidad en los capítulos 2 y 3 de esta tesis doctoral, a continuación, se hace un breve resumen de los principales factores moleculares, alteraciones genéticas y epigenéticas con valor pronóstico en los pacientes con MU.

II. 6.3.1 Biomarcadores séricos

Dado el elevado tropismo hepático de las lesiones metastásicas procedentes del MU, históricamente se han tratado de identificar biomarcadores séricos de origen hepático que permitan pronosticar el avance fatal de la enfermedad. Así, a menudo, en los estudios de función hepática llevados a cabo en pacientes con MU, se suele incluir el análisis de los niveles séricos de ciertas enzimas hepáticas como la alanina aminotransferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST), la alcalino fosfatasa (FAL), la gamma-glutamil transferasa (GGP), la deshidrogenasa láctica (LDH) y la bilirrubina, cuyos niveles parecen incrementarse en presencia de metástasis[137].

Sin embargo, la baja sensibilidad y especificidad de los niveles de estas enzimas hepáticas y su escaso valor predictivo positivo, han fomentado en gran medida la búsqueda de nuevos marcadores serológicos capaces de detectar la progresión de la enfermedad. Esta búsqueda, se centró en tratar de correlacionar biomarcadores ya descritos en el MMC con el MU, como S100β, la proteína MIA (del inglés, Melanoma Inhibitory Activity), o la osteopontina (OPN). En el caso de S100β, se vio que carecía de valor predictivo y que sus valores séricos no se correlacionaban con otros factores pronóstico en MU. Para la proteína MIA, aunque niveles séricos normales de la misma no

permiten excluir la progresión de un MU, la alteración de sus niveles sí puede correlacionarse con metástasis. Respecto a la proteína OPN, sus niveles séricos se correlacionan con las metástasis de melanoma en el hígado con una especificidad y sensibilidad significativas[137].

Asimismo, se estudiaron ciertos factores de crecimiento hepático como el factor de crecimiento-1 similar a insulina (del inglés, Insulin Growth factor type 1; IGF-1), el factor de crecimiento de hepatocitos (del inglés, hepatocyte growth factor type-1; HGF), o el factor de crecimiento epidérmico (del inglés, epifermal growth factor; EGF). Y se vio que las concentraciones séricas de los receptores de alguno de estos factores, como el HGFR o el EGFR, indicaban progresión a enfermedad metastásica y una reducción en la supervivencia de los pacientes, mientras que los niveles de IGF-1, por el contrario, parecen reducirse en pacientes con metástasis[137].

Más recientemente, también se estudió la posible relación entre los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) y el desarrollo de metástasis, observando que un aumento del VEGF en mediciones seriadas podría indicar el desarrollo de metástasis en el MU. Además de los mencionados, se han estudiado otros marcadores que no sólo se expresan en el MU, sino también en muchos otros tumores malignos y, por ello, resultan de poco valor a nivel predictivo[137].

II. 6.3.2 Proteínas identificadas a partir de cultivos celulares

Estudios pioneros llevados a cabo por la URQTIA en proteoma de un cultivo primario de MU (MU-A) establecido por el propio grupo, permitieron detectar un total de 683 proteínas procedentes de 393 genes distintos y de las cuales, el 18% estaban relacionadas con procesos de carcinogénesis. Cabe destacar el papel de las proteínas MUC18 y HMG-1. Para la primera, que ya había mostrado asociación con el potencial metastásico de otros tipos de cáncer, se demostró relación con la invasión *in vitro* en el MU[138].

Posteriormente, se caracterizaron las proteínas del secretoma procedente de ese mismo cultivo celular y de otras líneas celulares previamente establecidas (SPS6.5, UW-1, 92.1, OCM-1), detectándose proteínas importantes en el desarrollo de cáncer como PMEL/ME20M,

DJ-1/PARK7, catepsina D o syntenin-1[137]. Curiosamente, los niveles séricos de DJ-1, ME20M y la catepsina D eran más altos en los pacientes con MU en comparación con los de individuos sanos[139,140]. Y, en estudios posteriores, se demostró que las concentraciones en suero para DJ-1 estaban significativamente elevadas en pacientes con nevus coroideos que presentaban factores de riesgo de malignidad[141], apuntando a DJ-1 como un posible marcador de malignidad. Por el contrario, PMEL/ME20M mostró niveles reducidos en el grupo control o en individuos con nevus coroideos en comparación con los pacientes con MU no tratados o con metástasis, sugiriendo un papel prometedor para el MU y útil en la monitorización de la enfermedad metastásica[142].

II. 6.3.3 Factores citogenéticos

La mayor parte de los MU muestran la presencia de alteraciones cromosómicas recurrentes que implican a los cromosomas 1p, 3, 6 y 8, fundamentalmente. La presencia de estas alteraciones se ha asociado con distintas evoluciones clínicas de la enfermedad, siendo la pérdida de una copia completa del cromosoma 3 (Monosomía 3; M3), la que ofrece una mayor implicación pronóstica[143]. Como veremos con detenimiento en el segundo capítulo de esta tesis doctoral, la M3, las ganancias en brazo largo del cromosoma 8 (8q) o las pérdidas en el brazo corto del cromosoma 1 (1p) y en el brazo largo del cromosoma 6 (6q) se asocian con mal pronóstico de la enfermedad[143-147]. Se ha visto que los marcadores citogenéticos aportan una mayor fiabilidad pronóstica que los factores clínicos e histopatológicos con valor pronóstico. Hoy en día, hay varias técnicas disponibles que nos van a permitir detectar estas alteraciones, algunas más clásicas como los estudios de citogenética convencional y molecular y otras más modernas basadas en procedimientos de hibridación y reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction; PCR) (Figura 7). Dichas técnicas se describirán en detalle en el transcurso de esta tesis doctoral.

II. 6.3.4 Mutaciones somáticas

Además de las alteraciones citogenéticas con valor pronóstico, más recientemente se ha descrito que la presencia de mutaciones en determinados genes también parece mostrar valor pronóstico en el MU. Dichas mutaciones se identificaron a partir de la secuenciación de tejidos primarios procedentes de MU. Este tema será motivo del estudio llevado a cabo en el capítulo 3 de esta tesis doctoral, donde como veremos detalladamente, mutaciones en genes como *BAP1 o SF3B1* se asocian con un pronóstico adverso e intermedio de la enfermedad, respectivamente[148-151]. Mientras que las presentes en el gen *EIF1AX*, se asocian a un pronóstico favorable[150,152] (Figura 7).

II. 6.3.5 Epigenética

El valor de la epigenética en el pronóstico del MU se ha ido haciendo patente en la bibliografía. La epigenética constituye un área de conocimiento emergente que supone el estudio de las modificaciones con relevancia funcional en el genoma que llevan a la expresión diferencial y/o represión de genes. En cáncer, se ha descrito una elevada prevalencia de cambios de naturaleza epigenética y se ha visto que pueden estar implicados en todos los niveles de desarrollo y progresión de este tipo de patologías, incluso sin la necesidad de células con mutaciones genéticas específicas. Dentro de los mecanismos epigenéticos implicados en cáncer, se incluyen variaciones en los niveles de expresión de determinados microARN, la hipermetilación de genes supresores de tumores, la hipometilazión de oncogenes y la modificación de los patrones de metilación en histonas[153].

En el caso específico del MU, se ha descrito que determinados microARN como miR-137, que actúa como supresor tumoral, pueden ser silenciados durante el proceso de tumorogénesis del MU[153,154]. Además, otras variantes de microARN se expresan de manera diferencial en los MU con alto o bajo riesgo de metástasis y en los metastásicos frente a los no metastásicos[153-155]. Por otro lado, la expresión de ciertos genes, como *RASSF1A*, está regulada por medio de variaciones en el patrón de metilación de los mismos. Este gen se localizada en el cromosoma 3 y su ausencia o inactivación en el MU contribuye a la aparición y progresión de este tipo de tumores[156]. En

concreto, en los tumores con M3, el silenciamiento de este gen por medio de su metilación podría actuar como un "segundo *hit*", participando en el desarrollo y progresión tumoral[156]. Este gen se encuentra metilado en aproximadamente el 13-70% de los MU[157]. Aunque también se ha descrito la hipometilación de ciertos genes en MU, ésta es mucho menos común que la hipermetilación. Uno de los ejemplos más claros de esta marca epigenética, es la hipometilación diferencial de *PRAME* (del inglés, Preferentially Expressed Antigen in Melanoma), asociada a un riesgo mayor de metástasis[158].

Otro ejemplo de alteración epigenética en el MU, es la metilación y correspondiente inactivación del gen *CDKN2A*, que codifica para el supresor tumoral p16Ink4a que actúa activando a la proteína Rb mediante el bloqueo de su fosforilación por medio de la vía ciclina D/CDK4. Por tanto, la inactivación por metilación de *CDKN2A*, conduce a una hiperfosforilación (inactivación) de la proteína Rb que, consecuentemente no puede llevar a cabo su función como supresor tumoral, conduciendo a una proliferación celular descontrolada y a la evolución en el desarrollo del MU[159].

II. 6.3.6 Perfil de expresión génica

Los MU también pueden ser clasificados en dos grupos principales de riesgo en base al perfil de expresión génica que muestren para un grupo seleccionado de genes (Figura 7).

En el año 2004, Onken et al. propusieron la clasificación en MU de clase 1 (tumores con riesgo bajo de metástasis) y MU de clase 2 (tumores con elevado riesgo de metástasis)[160]. Estos autores publicaron una supervivencia a los 8 años del 95% para los pacientes con tumores de clase 1 y del 31% en los pacientes con tumores de clase 2[160]. Posteriormente, varias publicaciones apoyaron el valor predictivo de este test en el MU[161-163].

Para obtener una explicación más detallada de las bases moleculares y genes incluidos en este estudio, remitirse al apartado de introducción del capítulo 2.

II. 7. TRATAMIENTO

II. 7.1 TRATAMIENTO DEL MU PRIMARIO

En la actualidad, existen opciones terapéuticas diversas para tratar localmente el MU primario que varían de unos individuos a otros en función de la localización del tumor, su tamaño y si existe o no extensión extraocular. En la decisión terapéutica influyen, además, otras consideraciones como la edad de paciente, la existencia de comorbilidades, el estado de la agudeza visual de ambos ojos y la propia decisión personal del paciente[50].

Las principales opciones de tratamiento empleadas en la mayor parte de las unidades de oncología ocular, a nivel mundial, son la enucleación y la braquiterapia. Pero existen otras alternativas disponibles como la radioterapia de haz de protones, la termoterapia transpupilar, la fotocoagulación con láser, la radiocirugía estereotáctica y la resección local de tumor[18,52]. A continuación, se describen, brevemente, los principales tratamientos locales para el MU primario disponibles.

II. 7.1.1 Radioterapia

La radioterapia es la terapia de conservación del globo ocular más comúnmente empleada, y el método más extendido para el tratamiento del melanoma de coroides. Generalmente, se emplean placas de braquiterapia, mientras en algunos centros se recurre a técnicas basadas en el empleo de partículas cargadas (como el haz de protones) o a la radiación estereotáctica. Según expertos en el diagnóstico y tratamiento del MU, bajo el manejo clínico de un especialista en el campo y la adecuada selección de los pacientes a tratar con braquiterapia, no debería haber diferencias en cuanto al control local del tumor y las complicaciones desarrolladas entre la braquiterapia y el haz de protones, a pesar de que por el momento no existen estudios comparativos directos[50].

II. 7.1.1.1 Braquiterapia

La braquiterapia es un método de radioterapia que consiste en aplicar una fuente radioactiva sobre la base escleral del tumor a tratar. Para ello, se utilizan placas epiesclerales con forma de cuenco y con un

diámetro que oscila entre los 12 y los 20 mm. La parte interna de estas placas contiene las fuentes radioactivas, mientras que la parte externa está revestida de un metal pesado, habitualmente oro. Además, la placa presenta unas ranuras para su fijación a la esclera mediante sutura. Se han empleado numerosos tipos de radioisótopos para tratar el MU, siendo los más empleados el iodo 125 (^{125}I) y el rutenio 106-rodio 106 (^{106}Ru/^{106}Rh).

El empleo de esta técnica está indicado en tumores de tamaño pequeño y mediano, según la clasificación del COMS[110]. Expertos en el diagnóstico y tratamiento del MU, han sugerido que mediante el uso de braquiterapia puede alcanzarse control local del tumor primario en cerca del 98% de los casos, conservando el globo ocular en aproximadamente el 95% y, a menudo, con retención útil de la visión[110,164]. A ello, hay que sumar que la tasa de recidiva local se reduce significativamente para los tumores más pequeños, siendo sólo del 3% a los 7 años[165]. No obstante, también es necesario tener en cuenta que puede ocasionar complicaciones que podrían aparecer incluso 3-5 años postratamiento[166].

II. 7.1.1.2 Haz de protones

En algunas unidades de oncología ocular, se emplea la radioterapia basada en el uso de un haz de protones o iones de helio finamente colimado, proporcionando una dosis de radiación uniforme al tumor y minimizando posibles daños colaterales a los tejidos colindantes[167,168]. En el 95-98% de los casos se alcanza el control local del tumor, siendo el riesgo de recurrencia local del 5% a los 10 años del tratamiento[167].

II. 7.1.1.3 Radiación estereotáctica

Se trata de una técnica en la que, múltiples haces de fotones o radiación gamma son dirigidos al tumor desde diferentes direcciones, bien simultáneamente o secuencialmente. De este modo, se aplica una elevada dosis de radiación sobre el tumor minimizando posibles daños colaterales sobre los tejidos sanos colindantes[18,50]. Este método se emplea como terapia alternativa al haz de protones en centros donde no es posible administrar esta última[18].

II. 7.1.2 Cirugías

II. 7.1.2.1 Enucleación

La enucleación, o extirpación del globo ocular, es la técnica clásica por excelencia en el tratamiento del MU. Sin embargo, con la incorporación de nuevas aproximaciones terapéuticas, aplicadas de manera aislada o en combinación, ha ido adquiriendo cada vez un menor protagonismo. En la actualidad, está indicado en melanomas no susceptibles de tratamiento conservador (tumores con >10 mm de altura o >18 mm de base), ojos ciegos o dolorosos por glaucoma secundario, invasión del nervio óptico o extensión extraescleral amplia[18,52].

II. 7.1.2.2 Resección local

Supone la extirpación quirúrgica del tumor, ya sea en bloque (exorresección) o de forma fragmentada con un vitrectomo a través de la retina (endorresección). Estos métodos están indicados en tumores circunscritos inadecuados para radioterapia dado su gran tamaño o su localización yuxtapapilar[18,50]. Su ventaja, es que proporciona material para confirmar el diagnóstico y/o llevar a cabo test moleculares con valor pronóstico, preservando el globo ocular[50]. En algunos estudios se ha sugerido que la endorresección debe ser combinada con radioterapia a dosis bajas para que el resultado sea eficaz[169].

II. 7.1.3 Terapias con láser o fototerapia

Este grupo de tratamientos engloban la terapia fotodinámica y la termoterapia transpupilar.

II. 7.1.3.1 Terapia fotodinámica

En la terapia fotodinámica se emplea un láser no térmico para activar un colorante fotosensible (verteporfina), que circula por la coroides al ser previamente inyectado por vía intravenosa, para inducir el cierre vascular, la necrosis tumoral y la apoptosis celular. No obstante, la pigmentación del tumor suele interferir con este método de terapia y es más eficaz, por tanto, en tumores amelanóticos[18,50].

II. 7.1.3.2 Termoterapia transpupilar

Con la termoterapia transpupilar, el tumor se somete a calor durante unos pocos segundos, aproximadamente un minuto, por medio de un láser infrarrojo para tratar de interrumpir la actividad de las células tumorales por calor. Esta terapia se ha recomendado para tumores de hasta 4 mm de grosor y se recomienda la braquiterapia como terapia complementaria para evitar la recidiva local del tumor, que tiene lugar en aproximadamente un 20% de los pacientes en los que se utiliza la termoterapia como único tratamiento local[18,50].

II. 7.2 TRATAMIENTO EN LA ENFERMEDAD METASTÁSICA

Actualmente, todavía existe una limitación en cuanto al tratamiento del MU metastásico debido a la falta de terapias sistémicas eficaces. Por ello, no hay un protocolo estándar de tratamiento y se fomenta la inclusión de los pacientes en ensayos clínicos tanto para terapias adyuvantes como para etapas avanzadas de la enfermedad, aunque el número de ensayos clínicos específicamente diseñados para el tratamiento del MU continúa siendo reducido. A nivel quirúrgico, se ha visto que, en pacientes seleccionados, la resección o ablación de las lesiones oligometastásicas hepáticas puede mejorar el pronóstico[50]. No obstante, otras aproximaciones terapéuticas sin mejora significativa, por el momento, en la supervivencia de los pacientes, han sido y continúan siendo testadas.

En cuando a la quimioterapia sistémica habitual, el MU ha mostrado una amplia resistencia intrínseca que ha llevado a la investigación de nuevos enfoques terapéuticos como la quimioterapia intraarterial, la perfusión hepática aislada y la quimioembolización, basándose en el principio de que dichas lesiones se nutren de las ramas de la arteria hepática[50]. Hasta la fecha, se han completado dos ensayos clínicos en fase III de terapias dirigidas al hígado, uno con fotemustina y otro con melfalán, y aunque ambos estudios han demostrado mejoras en la respuesta de los pacientes y el control de la enfermedad, ninguno de ellos demostró un efecto significativo en cuanto a la supervivencia de los mismos. Algunos de los agentes quimioterapéuticos testados en el MU son los habitualmente empleados en el tratamiento del MMC, pero ninguno de ellos ha demostrado tener una mejora significativa en

la supervivencia de los pacientes[50].

Otra de las estrategias que ha sido ampliamente estudiada, es el desarrollo de terapias dirigidas fundamentalmente a la inactivación de la vía MAPK/ERK, a nivel de MEK o PKC tanto de manera aislada, como en combinación con agentes enfocados a la vía de señalización AKT/PI3K, con un beneficio terapéutico muy limitado en la población estudiada[170-172]. Otras terapias dirigidas directamente a GNAQ, a efectores *downstream* de GNAQ y modificaciones epigenéticas, también fueron testados. Estos fármacos han demostrado en estudios preclínicos ser selectivos para los modelos *GNAQ* y *GNA11* mutados, sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos continúan siendo bastante limitados. Por ejemplo, el tratamiento con selumetinib, inhibidor de MEK, ha mostrado beneficios significativos en la supervivencia sin progresión, con una tendencia hacia la mejora en cuanto la supervivencia de los pacientes, aunque, en este caso, no significativa[170,172].

En cuanto a las opciones de inmunoterapia, los buenos resultados obtenidos para ciertos fármacos inmunoterápicos en otros tipos de cáncer como el MMC, despertaron el interés de su estudio en MU. De este modo, se testaron algunos fármacos que actúan como inhibidores de los puntos de control inmunitarios a nivel de CTLA4 (del inglés, Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) o PD1[50,99,173-175]. Así, por ejemplo, el fármaco Ipilimumab, un agente inmunomodulador anti-CTLA4, ha demostrado estabilizaciones de la enfermedad metastásica a largo plazo[175]. Por otro lado, se ha estudiado, también, la combinación de fármacos anti-CTLA4 con el anticuerpo anti-PD1[173,175], pero los estudios han mostrado tasas de respuesta inferiores al 10% y supervivencia media de los pacientes inferior a 1 año[175]. Nuevas aproximaciones en cuanto a estrategias basadas en terapias celulares, como la terapia adoptiva con células T[176] o la redirección de células T[177], también están siendo testadas y han demostrado resultados preliminares prometedores.

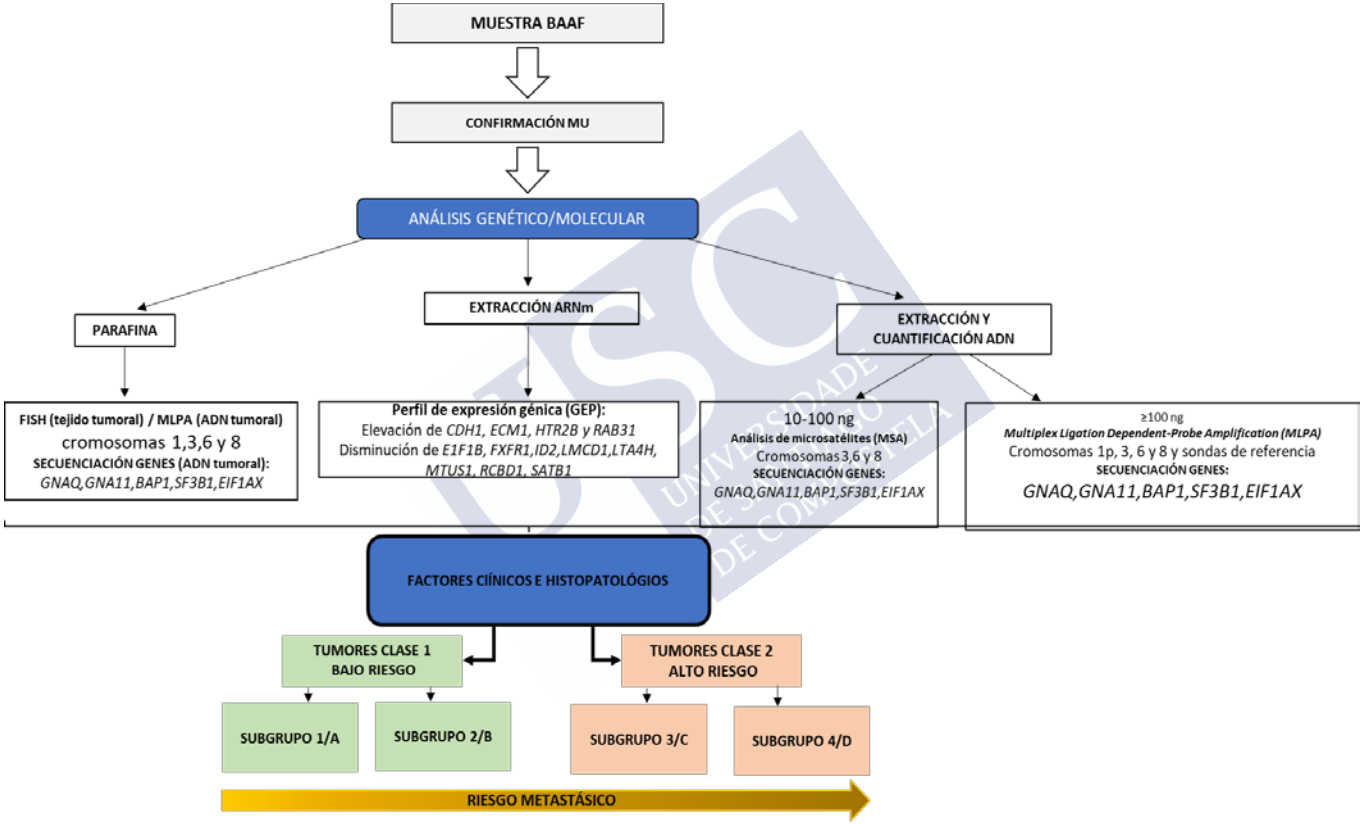


Figura 7: Esquema resumen del protocolo habitualmente seguido en distintas unidades de oncología ocular para el análisis molecular de muestras procedentes de MU. Esquema modificado y actualizado de "Identification of biomarkers of metastatic disease in uveal melanoma using proteomics analyses"; Tesis doctoral M.Angi, University of Liverpool[178].

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III. ESTUDIOS REALIZADOS

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1: BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES DE PREDISPOSICIÓN A MELANOMA UVEAL BILATERAL MEDIANTE UNA ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C1. 1. INTRODUCCIÓN

C1. 1.1 EL MELANOMA UVEAL BILATERAL PRIMARIO

C1. 1.1.1 Tasa de incidencia

El MU se presenta, generalmente, como un tumor unilateral y unifocal, siendo la aparición de formas bilaterales o multifocales en un solo ojo, un acontecimiento de extremada rareza. No obstante, en la literatura se ha descrito la existencia de casos de melanoma uveal bilateral primario (MUB)[179-185] (Tabla 3).

La información específica acerca del MUB disponible actualmente en la bibliografía, procede de la publicación de casos clínicos aislados o de pequeñas series de pacientes, siendo ocho el número máximo de casos descritos en un mismo artículo[179]. Se trata, por tanto, de una entidad poco conocida y, el trabajo que reúne el mayor número de casos de MUB, recientemente publicado, es un estudio retrospectivo, descriptivo, demográfico y epidemiológico, que compara 52 casos de MUB con 8 915 casos de MU de los cuales sólo 46 proceden de artículos bien documentados y publicados en lengua inglesa entre los años 1950 y 2016[186].

A nivel histórico, el primer MUB publicado en Estados Unidos, data de 1959 y fue descrito por Wiesinger et al., quienes describieron un paciente con MUB afectado, además, de leucemia y meningioma [181]. Aunque previamente se habían descrito ya algunos casos, en ninguno de ellos se aportaba evidencia de las características histopatológicas del tumor contralateral. Posteriormente, en el año 1977, Shammas et Watzke publicaron un caso clínico de una mujer de 55 años que desarrolló de manera secuencial un melanoma de coroides bilateral, en un intervalo de tiempo de cuatro años. Además, en su publicación ambos autores estimaron que la probabilidad de aparición de un MUB equivale a la aparición de 1 caso cada 50 millones de Caucásicos, o dicho de otra manera, 1 caso cada 18 años en todo Estados Unidos[182]. Para calcular dicha probabilidad, basaron sus estudios en la tasa de

incidencia del MU unilateral, neoplasia ya de por sí de escasa frecuencia, a pesar de ser el tumor intraocular primario más común en adultos.

Con el paso del tiempo, en la bibliografía se han visto reflejadas ciertas discrepancias en cuanto a la incidencia real del MUB, ya que algunos autores consideran que el número de casos observados de esta patología, es superior al número esperado por azar y a la estima poblacional calculada inicialmente por Shammas y Watzke[179]. Diferencias que son justificadas en base a la ausencia de un diagnóstico del MU contralateral en algunos pacientes, así como a la existencia de una predisposición genética a desarrollar este tipo de tumores. Aun así, se trata de una variedad de MU con una incidencia muy baja, y ciertos autores consideran que constituye menos del 0,2% del total de casos diagnosticados de MU en una única institución a lo largo de aproximadamente treinta años[179]. De hecho, en el año 2012, se publicó que en una cohorte de 8 803 pacientes diagnosticados de MU y con un seguimiento medio de 38 años, se detectaron únicamente 11 casos de MUB, menos del 1% del total de pacientes estudiados[109].

Respecto a la tasa de incidencia del MUB en relación al sexo, edad, o raza, no se han detectado diferencias con el MU unilateral, siendo mayor en individuos de sexo masculino, en individuos Caucásicos e incrementándose su aparición con la edad[1,9,186].

C1. 1.1.2 Causa, factores de riesgo, tratamiento y pronóstico

Aunque la mayor parte de las veces la aparición de un MU se produce de forma espontánea, se conocen diversas asociaciones fenotípicas que actúan como factores de riesgo y entre las que se incluyen: la transformación de un nevus benigno, la presencia de melanocitosis ocular preexistente, así como ciertos síndromes asociados a la aparición de otros tipos de lesiones melanocíticas y de cáncer[1,187-189].

En la bibliografía se han descrito casos en los que la presencia de melanocitosis ocular bilateral daba lugar a la aparición de un MUB así como a formas multifocales en un mismo ojo[183,190]. Dichos hallazgos sugieren que este fenotipo clínico podría ser un factor precursor, no sólo para las formas unilaterales, sino también para las formas bilaterales y

multifocales. Sin embargo, la existencia de lesiones pigmentarias preexistentes, no explicaría la totalidad de casos de MUB descritos en la bibliografía[191].

Del mismo modo, en varios estudios se descartó la existencia de una relación entre el desarrollo de un MUB con el MMC o la existencia de otro tipo de cáncer secundarios, así como ciertos síndromes como la neurofibromatosis tipo I, el síndrome de melanoma familiar atípico con molas múltiples o el síndrome de Li-Fraumeni, todos ellos reconocidos como potenciales factores de riesgo para el desarrollo de un MU[179]. Por todo ello, la etiología del MUB está menos clara que la de un MU unilateral[191]. Aunque, algunos autores postulan la idea de la existencia de una predisposición genética asociada a la presencia de mutaciones germinales, todavía no conocidas[179].

En cuanto a los aspectos histopatológicos, en los pacientes con MUB, en comparación con aquellos que presentan un MU unilateral, se ha descrito una afectación más común del ojo derecho en primer lugar, sin llegar a ser estadísticamente significativo. Asimismo, no se detectaron diferencias en cuanto al lugar de localización del tumor en el tracto uveal (coroides, iris y cuerpo ciliar), ni tampoco en las características histológicas, el estadio tumoral o la extensión extraocular en el momento del diagnóstico del MUB[186].

Por otro lado, se vio que la mayor parte de los pacientes con MUB descritos en la bibliografía, eran diagnosticados inicialmente de enfermedad unilateral, desarrollando subsecuentemente la enfermedad bilateral en un intervalo aproximado de 22 meses[186].

Con respecto al pronóstico de los pacientes con MUB, es similar al de aquellos afectados de MU unilateral. Tampoco se apreció diferencia en la supervivencia de los pacientes diagnosticados simultáneamente de un MUB, en relación a los diagnosticados inicialmente de enfermedad unilateral y posteriormente de bilateral. Por tanto, la presencia de un MUB no supondría, *per se*, un peor pronóstico de la enfermedad, siendo el tratamiento y tiempo medio de seguimiento similar al aplicado en los casos de MU unilateral. Sin embargo, sí se detectaron diferencias en cuanto al tratamiento aplicado a ambos melanomas de un paciente con MUB, siendo común la enucleación del primer ojo, frente al predominio de tratamientos conservadores en el melanoma del ojo contralateral[186].

Publicación/Fuente de información	Año	Autores	Tipo de estudio
Report of a case of bilateral sarcoma of the uveal tract.	1930	Shine et al.	Caso clínico
A case of malignant melanoma of the choroid successfully treated by radom seeds.	1949	Stallard et al.	Caso clínico
Simultaneous bilateral primary ocular malignant melanoma; report of a case.	1950	Cordes et al.	Caso clínico
Bilateral melanoma of the choroid associated with leukemia and meningioma.	1959	Wiesinger et al.	Caso clínico
Bilateral choroidal melanomas. Case report and incidence.	1977	Shammas&Wazke	Caso clínico
Bilateral malignant choroidal melanomas.	1980	Lubin et al.	Serie de casos (n=3)
Treatment of bilateral choroidal malignant melanoma.	1981	Lommatzsch et al.	Caso clínico
Bilateral primary choroidal melanoma.	1984	Migdal et al.	Caso clínico
Histopathology of uveal melanomas treated with charged particle radiation.	1987	Crawford et al.	Caso clínico
Bilateral uveal melanomas.	1987	Gailloud et al.	Serie de casos (n=3)
Two cases of primary bilateral malignant melanoma of the choroid.	1988	Seregard et al.	Serie de casos (n=2)
Bilateral ciliary body melanomas.	1989	Waterhouse et al.	Caso clínico
Simultaneous bilateral primary choroidal melanoma.	1989	Eide et al.	Caso clínico
Bilateral uveal melanoma presenting simultaneously.	1994	Omulecki et al.	Caso clínico
Simultaneous bilateral primary choroidal melanoma.	1996	Ascaso et al.	Caso clínico
Bilateral primary uveal melanoma. Bad luck or bad genes?	1996	Singh et al.	Serie de casos (n=8)
Bilateral malignant melanoma of the choroid in the United States.	1998	Ruiz et al.	Caso clínico
Sequential development of bilateral primary choroidal melanoma.	2000	Kiralti et al.	Caso clínico
Bilateral uveal melanoma: a series of four cases.	2003	Hadden et al.	Serie de casos (n=4)
Bilateral primary choroidal.	2006	Furuta et al.	Serie de casos (n=3)
Simultaneous appearance of acute myeloid leukemia in a patient with bilateral primary uveal melanoma.	2006	Buda et al.	Caso clínico
Bilateral uveal melanoma in an arc welder.	2011	Turaka et al.	Caso clínico
Prevalence of ocular and oculodermal melanocytosis in Spanish population with uveal melanoma.	2012	Carreno et al.	Caso clínico.
Bilateral choroidal melanoma-case analysis and literature review.	2015	Kowal et al.	Serie de casos (n=5)
Bilateral uveal melanomas with different gene expression detected with 7 years interval.	2016	Eide et al.	Caso clínico
Base de datos de patología del Hospital Universitario de Cleveland	1996-2016	Scott et al.2018	Caso clínico
Base de datos *Surveillance, Epidemiology and End-Results (SEER)-18*	1973-2013	Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program Research Data.	Serie de casos (n=5)
BAP1 Germline Mutation Associated with Bilateral Primary Uveal Melanoma.	2020	Yu MD et al.	Serie de casos (n=2)
Whole Exome Sequencing Identifies Candidate Genes Associated with Hereditary Predisposition to Uveal Melanoma	2020	Abdel-Rhaman MH.	Serie de casos (n=1)
Multiple Uveal Melanoma	2020	Wajiha J Kheir et al.	n=1

Tabla 3: Número de casos de MUB incluidos en el estudio epidemiológico más reciente y amplio llevado a cabo en MUB. (Tabla Adaptada y actualizada de Scott et al. 2018)[186].

C1. 1.2 PREDISPOSICIÓN GENÉTICA FRENTE AL MELANOMA UVEAL

C1. 1.2.1 Evidencia epidemiológica

A día de hoy, existe un amplio desconocimiento acerca de la causa del MUB, a lo cual hay que sumar la controversia existente en cuanto a los datos históricos de incidencia esperada del mismo y la tasa real de casos observados. Por todo ello, algunos autores consideran la posibilidad de que la aparición de un MUB no es casual, sino que se debe a la presencia de mutaciones germinales, todavía no conocidas, que podrían estar implicadas en la patogénesis de estos tumores[179]. Esta hipótesis se basó, no sólo en la identificación de formas bilaterales del MU, sino también en la detección de casos familiares, el diagnóstico de individuos jóvenes y pacientes con formas multifocales en un mismo ojo, factores todos ellos definitorios de los síndromes de predisposición a cáncer[192]. Igualmente, en el estudio demográfico y epidemiológico sobre el MUB recientemente publicado por Scott et al., se postula la idea de que *el desarrollo de un MUB sugiere la existencia de una predisposición genética a padecerlo, dada la coocurrencia de la enfermedad en un órgano par*[179,186].

Desde el año 1971, se estudió la coexistencia del MU con otros tipos de cáncer primario como el MMC hereditario, el cáncer de mama y ovario familiar o el cáncer de próstata, hecho que ha llevado a considerar la existencia de una predisposición conjunta a padecer este tipo de neoplasias, implicando a los genes *CDKN2A* y *BRCA2*, entre otros[192-195]. De hecho, se ha estimado que un importante número de los casos diagnosticados de MU presentan otras neoplasias primarias, siendo el cáncer de próstata y el de mama los más comunes[196].

Como ya se ha mencionado, se ha descrito la existencia de casos de MU familiar (MUF), lo cual no parece una cuestión de azar teniendo en cuenta la escasa incidencia del MU[197,198]. Asimismo, se han descrito factores que podrían implicar un riesgo incrementado de padecer un MU y que, por tanto; sugieren, una vez más, la sospecha de una susceptibilidad genética a padecer esta patología. Entre dichos factores de riesgo se encuentran: 1) diagnóstico de un MU a los 30 años de edad o antes, 2) dos o más casos de MU en una misma familia, 3) presencia de una segunda neoplasia primaria en un paciente diagnosticado de MU o 4) historia familiar de síndrome de predisposición a cáncer[199].

C1. 1.2.2 Estudio de genes de predisposición

De acuerdo con la información comentada en el apartado anterior, en un esfuerzo por determinar la existencia de una predisposición genética a padecer un MU se llevaron a cabo estudios de secuenciación para la identificación de genes candidatos[194,199-202].

En primer lugar, se estudiaron genes conocidos que ya habían sido asociados inicialmente con predisposición a otros tipos de cáncer como el MMC familiar o el cáncer de mama y/o ovario hereditario, detectados simultáneamente con el MU en las familias estudiadas[200-202]. Así, se estudió la presencia de mutaciones germinales en los genes *CDKN2A*, *CDK4*, *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes afectados de MU con una presentación clínica sugestiva de la existencia de susceptibilidad genética a desarrollar este tipo de neoplasias oculares. No obstante, se detectaron variantes genéticas deletéreas en un número muy reducido de los pacientes seleccionados para los genes estudiados. Lo cual condujo a descartar la idea de que estos genes contribuyesen a la predisposición frente al MU, puesto que el hallazgo de mutaciones germinales en alguno de ellos de manera aislada en alguna de las familias estudiadas, no sustentaba la suposición de que estos genes fuesen candidatos a explicar la existencia de predisposición genética frente al MU[194,200-205].

Posteriormente, se estudió la presencia de mutaciones germinales en el gen *GNAQ*, conocido por su elevada carga mutacional somática en MU. Para ello, al igual que en los estudios anteriores, se seleccionó una cohorte de pacientes con alta sospecha de presentar predisposición frente a MU. Nuevamente, los hallazgos obtenidos descartaron a este gen como candidato para el desarrollo de un MU[206].

Por otro lado, el gen que codifica para el receptor de melanocortina-1 (*MCR1*) también fue estudiado en relación al MU, tratándose de un gen importante para la regulación de los niveles de melanina. Variantes en este gen se asocian con los distintos tipos de piel de acuerdo a la sensibilidad frente al sol y con el color del pelo. La proporción de esas variantes fue estudiada en casos de MU en dos estudios independientes, pero en ninguno de ellos se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la población general y los individuos afectados de MU[207].

En definitiva, estos trabajos condujeron a determinar que las mutaciones germinales en los genes candidatos seleccionados eran muy poco frecuentes en los pacientes con MU. Más recientemente, los avances en el estudio de los aspectos genéticos del MU orientaron el estudio de la predisposición a esta neoplasia maligna hacia el gen *BAP1*. Y recientemente, Yu et al. publicaron una breve reseña en la que dos pacientes no relacionados afectados de MUB presentaban mutaciones germinales en el gen *BAP1*[208]. Asimismo, en el año 2020, se publicaron otros tres estudios donde se proponen nuevos genes de predisposición genética a padecer un MU.

Por un lado, en un estudio basado en el uso de exomas para la búsqueda de nuevos genes de predisposición a MU, se propusieron como candidatos los genes *MLH1*, *PALB2* y *SMARCE1*, aunque con un nivel de evidencia moderada o limitada en todos los casos. Curiosamente, este estudio incluía un paciente afectado de MUB, pero no mostró la presencia de variantes patogénicas en los genes analizados[82]. En abril de 2020, en otro estudio publicado por Derrien et al., se propuso que las mutaciones germinales en el gen *MDB4* se asociaban a una predisposición genética frente al MU y, fundamentalmente, a tumores hipermetilados con monosomía 3[83]. Finalmente, en otro estudio publicado en Julio de 2020, se propuso que las mutaciones con pérdida de función en el gen *POT1* predisponían al desarrollo de MU[84].

C1. 1.2.3 El gen *BAP1*; estructura y función

El gen *BAP1* (del inglés, BRCA1 Associated Protein-1), se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21.1) y está compuesto por 17 exones que codifican para una enzima caracterizada por su actividad desubiquitinasa que actúa regulando numerosos procesos celulares[209].

A nivel estructural, la proteína BAP-1 tiene tres dominios: el dominio catalítico N-terminal con función desubiquitinasa; el dominio de unión al Factor 1 de la célula huésped HCF1 (host-cell factor-1); y el dominio C-terminal (CTC) de unión a proteínas como BRCA-1[210] (Figura 8).

La proteína BAP-1 actúa como supresor tumoral a través de su actividad catalítica desubiquitinasa, regulando la expresión de genes diana implicados en el control del ciclo celular y la diferenciación celular[209]. También cumple un papel fundamental en la reparación de daños en el ADN formando complejos con otras proteínas como BRCA-1 y BARD-1[210].

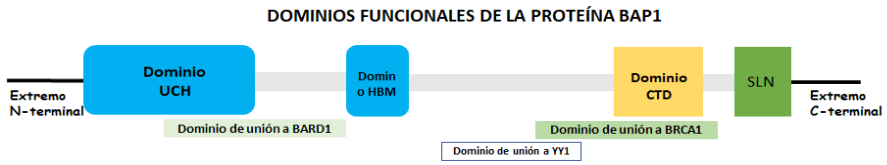


Figura 8. Esquema de la estructura de la proteína 1 asociada a BRCA-1 (BAP-1), representando sus dominios funcionales. UCH: dominio con actividad desubiquitinasa; HBM: dominio de unión al factor-1 de la célula huésped (HCF1); CTD: dominio C-terminal, SLN: señales de localización nuclear; dominio BARD1: región de unión a proteína BARD-1; dominio BRCA1: región de unión a proteína BRCA-1, YY1: Región de unión al factor de transcripción Ying-Yang 1. (Imagen adaptada de B. Masoomian et al[211]).

Para desempeñar su papel como supresor tumoral, la proteína BAP-1 depende de su función desubiquitinasa y de su localización nuclear, por lo que mutaciones que afecten a los dominios UCH o SLN, pueden interrumpir su funcionalidad[212]. No obstante, aunque inicialmente se creía que todas las funciones asociadas a este gen requerían de su localización nuclear, recientemente se demostró que cumple funciones a nivel citoplasmático promocionando la apoptosis. Además, las células de individuos que portan mutaciones germinales en heterocigosis para este gen, tienen una firma metabólica distinta que da lugar a la interrupción de la respiración mitocondrial con un incremento en la glucólisis aeróbica que provoca el efecto Warburg. Este efecto hace que las células tumorales queden protegidas frente a los procesos de hipoxia[213].

C1. 1.2.3.1 Mutaciones germinales en *BAP1*

La prevalencia de mutaciones germinales en *BAP1* en pacientes diagnosticados de MU pero sin sospecha clínica de predisposición a estos tumores, se sitúa entre el 2% y el 3%[214] elevándose hasta el 22-25% en los casos de MUF[215,216].

Es necesario tener en cuenta que la presencia de otros tipos de cáncer en una misma familia además de MU, confiere una probabilidad incrementada de detectar mutaciones germinales en este gen. Por ello, en aquellas familias con MUF y sin la presencia de otros tipos de tumores asociados a *BAP1*, la prevalencia de estas mutaciones se reduce al 8%. En contraposición, la presencia de otros tipos de cáncer como el MMC, el mesotelioma, o el carcinoma de células renales, hacen que la probabilidad de encontrar mutaciones germinales en *BAP1*, se incremente hasta el 50%[215].

En el gen *BAP1*, se han descrito varios tipos de alteraciones, que oscilan desde deleciones de gran tamaño, hasta cambios nucleotídicos puntuales, siendo las pequeñas inserciones y deleciones y las mutaciones sin sentido (del ingés, *nonsense*), las detectadas con mayor frecuencia[211].

Dada la complejidad de las funciones llevadas a cabo por la proteína codificada por *BAP1*, es lógico pensar que el tipo de mutación y el dominio funcional al que afecta, tendrán consecuencias funcionales y patológicas distintas. Así, las mutaciones truncantes se producen, por lo común, en regiones que afectan a los dominios C-terminal y en el dominio que contienen las señales de localización nuclear (SLN) afectando a su función de supresor tumoral (Figura 8). Por el contrario, las mutaciones de cambio de aminoácido, suelen afectar al dominio desubiquitinasa (UCH) (Figura 8) y, a día de hoy, la mayor parte se consideran de significado incierto[217,218].

No obstante, todos los tipos de mutaciones han sido identificadas en distintas variedades de cáncer[211,218]. Esto sugiere que el tipo de mutación germinal no determina el desarrollo de un tipo de tumor u otro, por lo que se desconoce el mecanismo molecular que da lugar a la aparición de las distintas neoplasias. Algunos autores, postulan que podría ser debido a la presencia de diferentes combinaciones de mutaciones germinales en otros genes[211].

C1. 1.2.3.2 Síndrome de predisposición a tumores asociado a *BAP1*

El interés por el estudio del gen *BAP1* en relación a la predisposición a MU, surgió de su papel como supresor tumoral actuando como inhibidor de la proliferación y el crecimiento celular, así como de la observación clínica de varios tipos de tumores en una misma familia afectada también de MU[197,199,219].

En concreto, el estudio de casos familiares de mesotelioma, un tumor de reducida frecuencia en la población, llevó a la observación de individuos que presentaban, además, un MU[219,220]. La coexistencia de estos dos tipos de tumores, poco frecuentes, en una misma familia e incluso en un mismo individuo, levantó sospechas de la existencia de un factor genético común[220]. Lo estudios genéticos de ligamiento indicaron que la región cromosómica candidata a la predisposición frente al desarrollo de estos tumores se localizaba en el cromosoma 3p21, y la secuenciación de esta región cromosómica, permitió determinar que el gen mutado a nivel germinal en estas familias era *BAP1*[149,220].

Desde ese momento, se confirmó la presencia de mutaciones germinales en *BAP1* en varios tipos de cáncer como el mesotelioma maligno, el MU, el MMC, meningiomas, adenocarcinoma de pulmón o el carcinoma de células renales[77,149,220-223]. Estos hallazgos llevaron a la descripción, por tres grupos de investigación independientes, del síndrome de predisposición a tumores asociado a *BAP1* (SPDT-BAP1, MIM #614327). Un nuevo síndrome de predisposición a cáncer con herencia autosómica dominante y con elevada penetrancia, manifestando al menos el 85% de los individuos con mutaciones germinales en *BAP1,* alguno de estos tumores. Aunque, el tipo de tumor desarrollado con una misma mutación, variaba mucho incluso entre miembros de una misma familia[149,220,221,224].

Los mecanismos moleculares y las vías de señalización necesarias para el desarrollo de un tipo u otro de tumor, continúan sin estar claros[210]. Además, el espectro de tumores asociado a este síndrome, ha continuado incrementándose con el avance de los estudios genéticos, incluyéndose dentro de esta entidad otros tipos de cáncer como el carcinoma de células basales, el cáncer de mama y/o ovario, ciertos

tumores neuroendocrinos y algunos tipos de sarcomas[210,224]. Weisner et al., también describieron que las mutaciones germinales en *BAP1* se asociaban con la presencia de lesiones melanocíticas cutáneas benignas que denominaron *tumor intradérmico atípico asociado a mutaciones en BAP1* (MBAIT) o *tumor atípico de Spitz* (AST), por encontrarse histológicamente a medio camino entre un MMC y un nevus de Spitz[221].

A pesar de la gran variedad de tumores incluidos en el espectro de este nuevo síndrome de predisposición a cáncer, el tumor más prevalente en los individuos afectados por este síndrome, es el MU, con tasas de incidencia del 8,5% al 31% [224,225].

C1. 1.2.3.3 El MU familiar

La mayor parte de los casos de MU se producen de manera esporádica, pero en la literatura se han reportado casos de melanoma uveal familiar (MUF), definido como la presencia de dos o más casos de MU en una misma familia y constituyendo en torno al 0,6% de todos los casos diagnosticados[197-199,215].

La observación clínica de familias con MU, fue otro de los factores que llevó a considerar la existencia de una predisposición genética frente a este tumor. Muy pocos genes han sido implicados en la predisposición a MUF, aunque el gen *BAP1* es el que, nuevamente, ha mostrado una mayor asociación[210,226,227].

En las familias con MUF, se ha descrito una mayor probabilidad de desarrollar otros tipos de cáncer y, de hecho, la tasa de neoplasias primarias secundarias en estos pacientes es unas tres veces superior a la de pacientes no seleccionados de MU[215]. A pesar de ello, el MUF es muy poco común y raramente afecta a más de dos o tres miembros en una misma familia, lo cual sugiere una penetrancia reducida para esta patología[197]. Se han propuesto dos posibles hipótesis para explicar este fenómeno; 1) la necesidad de la pérdida de una segunda copia de *BAP1* para que el efecto de la mutación germinal se manifieste[210], o la presencia de mutaciones en genes como *GNAQ* o *GNA11*[226,228].

A pesar de que *BAP1* es el gen mutado a nivel germinal más común en los casos de MUF, sólo un 25% de las familias muestran mutaciones en él. Hecho que sugiere, de nuevo, que el estudio genético del MUF puede contribuir a la identificación de nuevos genes candidatos[215,216].

C1. 1.2.3.4 El MU en pacientes jóvenes

En la bibliografía, se ha descrito la existencia de pacientes afectados de MU con edad inferior a 30 años. El número es muy reducido y en ocasiones va asociado a la presencia de factores de riesgo conocidos como la melanocitosis ocular. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los factores genéticos que confieren susceptibilidad a desarrollar un MU a una edad temprana[229]. De hecho, el único gen para el cual, por el momento, se ha demostrado una relación causa-efecto en estos pacientes es *BAP1*. Pero se ha visto que la prevalencia de mutaciones germinales para *BAP1* en pacientes jóvenes, es escasa, reiterando la idea de la existencia de genes alternativos asociados a predisposición a MU[229].

C1. 1.2.3.5 Formas bilaterales o multifocales

Otro de los factores clínicos que históricamente ha sustentado la idea de una predisposición genética frente al MU, radica en la existencia de formas bilaterales o multifocales de MU[179,186,192]. No obstante, el único estudio publicado donde se asocia el desarrollo de un MUB con mutaciones germinales en un gen concreto, sitúa al gen *BAP1* como único responsable del desarrollo bilateral de este tumor[208].

C1. 1.2.3.6 Genes relacionados con factores de riesgo a MU

Además de las asociaciones fenotípicas que confieren riesgo frente a MU mencionadas previamente, otros factores como el color claro de piel e iris o la imposibilidad para broncearse, podrían estar relacionados con esta neoplasia. Por ello, algunos autores han sugerido que el fondo genético de estas características podría estar relacionado con la susceptibilidad frente al MU[192,230].

Por ejemplo, genes relacionados con el color del iris como: *OCA2, HERC2, IRF4, TYR, TYRP1, SLC24A o SLC45A2*, se han propuesto como posibles candidatos de predisposición a MU[230-232]. Posiblemente, el riesgo incrementado de padecer un MU que presentan los individuos con ojos azules o grises podría ser debido a una mayor transmisión de la luz clara hacia el interior del ojo, a la presencia de un menor número de melanosomas o pigmento en el iris, o a niveles inferiores de melanina coroidea[63].

C1. 1.3 IDENTIFICACIÓN DE GENES CAUSALES EN ENFERMEDADES MENDELIANAS

Muchas de las enfermedades que conocemos hoy en día, son causadas por variantes patogénicas en un gen concreto. Dichas variantes, pueden estar presentes bien en heterocigosis donde, siguiendo un modelo autosómico dominante un solo alelo mutado es capaz de producir la enfermedad, o bien en homocigosis de acuerdo a un modelo autosómico recesivo donde serían necesarios dos alelos. Este grupo de enfermedades constituyen lo que habitualmente se conoce como enfermedades mendelianas. A pesar de que, por lo general, se trata de patologías poco comunes en la población, colectivamente afectan a un número sustancial de personas[233].

En muchos casos, los pacientes afectados por este tipo de enfermedades carecen de un diagnóstico claro. Ya que, aunque el estándar de la práctica clínica implica el reconocimiento de características fenotípicas y pruebas metabólicas y genéticas específicas, muchos pacientes permanecen sin diagnóstico una vez concluido este proceso[234]. La falta de un diagnóstico puede tener consecuencias fatales para los pacientes y sus familias, pudiendo imposibilitarse el acceso a un tratamiento adecuado, la incapacidad de poder detectar el riesgo de recurrencia en futuros embarazos, así como no poder determinar unas guías de seguimiento y pronóstico adecuadas.

Existen varias estrategias que pueden ser seguidas para la identificación de nuevos genes asociados a patologías concretas. Históricamente, las estrategias clásicas se han centrado en distintos métodos de mapeo genético para acotar regiones candidatas que posteriormente son secuenciadas con la intención de identificar la variante deletérea causal (estudios de análisis de ligamiento, mapeo genético por cariotipado, estudio de variaciones en el número de copias o mapeo por homocigosidad).

Otra posibilidad para la búsqueda de la causa genética de una patología mendeliana, consiste en centrar el estudio en genes que estén implicados en vías de señalización relacionadas con la enfermedad a estudiar, una aproximación que puede resultar especialmente útil en casos donde ya se han relacionado algunos genes con la patología en estudio.

El gran avance de las tecnologías de secuenciación masiva desde el año 2005, ha determinado una revolución a la hora de abordar el estudio de estas enfermedades[235]. En los siguientes subapartados, se describe brevemente la aplicación de la secuenciación de nueva generación a la búsqueda de nuevos genes asociados a una patología en concreto y algunas de las técnicas empleadas con mayor frecuencia en la búsqueda de genes responsables de enfermedades mendelianas.

C1. 1.3.1 Secuenciación de nueva generación

C1. 1.3.1.1 Concepto y contextualización histórica

La secuenciación de nueva generación (del inglés, Next Generation Sequencing; NGS), constituye un conjunto de nuevas tecnologías, posteriores a la secuenciación Sanger, que permiten producir grandes cantidades de datos a un precio relativamente reducido y realizándose la secuenciación de miles de fragmentos de ADN de manera simultánea y masiva.

Las tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, existen desde hace aproximadamente unos 40 años y han sido un ejemplo de progreso tecnológico continuo con el objetivo de alcanzar una mejor eficiencia en cuanto a coste y rendimiento[236]. Así, las plataformas de secuenciación masiva, han supuesto una revolución científica en el campo de la investigación biológica y biomédica.

Se trata de una serie de tecnologías que facilitan la colección de información genética procesando grandes cantidades a ADN de una manera efectiva en coste y tiempo, permitiendo la identificación de cientos o miles de variantes genéticas en una sola reacción[237,238].

Durante décadas, la secuenciación Sanger ha dominado tanto el área de investigación como la del diagnóstico molecular, pero la rápida evolución de los nuevos secuenciadores, especialmente en cuanto a precisión y rendimiento, así como el abaratamiento del coste de secuenciación por base, han permitido una rápida expansión de su uso para fines diversos como la secuenciación del genoma completo, secuenciación de regiones dirigidas del genoma (exomas, genes concretos), estudios de secuenciación en ARN o estudios de metilación, entre otros[238].

C1. 1.3.1.2 Aplicación clínica

La aplicabilidad clínica de la secuenciación masiva es muy amplia y ha permitido identificar la causa genética subyacente de múltiples desórdenes, siendo especialmente útil en aquellos trastornos con base genética heterogénea[238].

La NGS, se ha incorporado con frecuencia, y a menudo con buen resultado, en la búsqueda de variantes genéticas raras después de que el estudio de secuenciación de un único gen en concreto resultase negativo, o incluso cuando el estudio de un elevado número de genes resultaba ser demasiado laborioso o económicamente costoso para llevar a cabo mediante secuenciación Sanger[237]. Además, se ha visto que también es útil en el estudio de fenotipos complejos raros, reduciendo la "odisea diagnóstica", a menudo requerida, para alcanzar el diagnóstico de un fenotipo concreto[239]. Por tanto, la incorporación de estas tecnologías a la práctica clínica, ha consolidado su utilidad en cuanto a la búsqueda de variantes raras en pacientes con fenotipos sugestivos de ser ocasionados por la presencia de variantes deletéreas en un gen[237].

No obstante, es necesario considerar que la utilidad clínica de la NGS varía mucho de unas patologías a otras y, de hecho, en la mayor parte de los casos, los hallazgos derivados de esta secuenciación no alteran el seguimiento, tratamiento y pronóstico de los pacientes, aunque sí facilitan el diagnóstico molecular que, en ciertos casos altamente complejos, resulta fundamental[237].

Otra aplicación importante a tener en cuenta, es que la información genética obtenida puede ser correlacionada con información médica relevante. Así, cuando se detecta una variante patogénica en un gen que podría explicar el fenotipo de un paciente, el clínico puede revisar en conjunto los resultados y la información clínica relevante, incluyendo el patrón de herencia, el pronóstico, posibles complicaciones o el seguimiento de los pacientes y de su familia, de ser requerido[237,239]. Toda esta información, permite estudiar a los posibles pacientes que se encuentren en riesgo de desarrollar un fenotipo concreto[237].

A ello, hay que sumar que, ocasionalmente, el hallazgo de la variante genética causativa de una patología permite determinar un pronóstico específico en relación a un gen[240,241] en asociación con datos

procedentes de casos clínicos y grupos de pacientes publicados, previamente, en la literatura. Asimismo, esta información permite al personal médico anticipar un seguimiento concreto frente a posibles comorbilidades a las cuales puede ser susceptible un individuo con un fenotipo determinado, o redirigir una terapia hacia un tratamiento más específico[237].

Por último, otra de las aplicaciones de mayor importancia en la práctica clínica derivadas de esta tecnología, es la posibilidad de ofrecer consejo genético a los individuos afectados y sus familias, pudiendo determinar el riesgo de recurrencia de un fenotípico específico. Lo cual permite la oferta de guías en futuros embarazos mediante diagnóstico prenatal o preimplantacional, detectar individuos de alto riesgo e incluso iniciar tratamientos presintomáticos[241].

C1. 1.3.1.3 Secuenciación de exomas

Una aproximación ampliamente utilizada en la actualidad para la identificación de la causa genética de una patología concreta, consiste en obtener la secuencia del exoma o del genoma completo como punto de partida y desde ahí, acotar las variantes que resulten de interés siguiendo diferentes estrategias de cribado.

La secuenciación de exoma, consiste en secuenciar de manera selectiva y específica las regiones del genoma que actúan codificando para proteína (exones) y que suponen, aproximadamente, un 1-2% del total del genoma. En la bibliografía se ha sugerido que la secuenciación de exomas es una herramienta efectiva para el diagnóstico genético[237].

El objetivo de la secuenciación de exomas, consiste en detectar variaciones de nucleótido único (del inglés, Single Nucleotide Variants; SNV) e *indels* (acrónimo de inserciones o deleciones) distribuidos a lo largo de las regiones codificantes del genoma y regiones intrónicas flanqueantes. Dichos cambios pueden ser neutrales cuando no ocasionan modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína (variantes sinónimas) o provocar cambios en la misma y entonces se consideran no sinónimos. A su vez, las variantes no sinónimas pueden clasificarse en distintos tipos según el efecto que provoquen en la proteína:

- Variantes de cambio de sentido (*missense*): aquellas que resultan del cambio de un aminoácido por otro.
- Variantes sin sentido (*nonsense*): las que introducen un codón de parada o *stop* prematuro en la secuencia de la cadena proteica, ocasionando el truncamiento del producto proteico.
- Mutaciones por desplazamiento de la pauta de lectura (*frameshift*): se trata de pequeñas inserciones y deleciones de uno o varios nucleótidos, que cambian el marco de lectura de la secuencia de nucleótidos y, *por ende,* dan lugar a la configuración de una proteína alterada.

Finalmente, otro tipo de alteraciones que pueden ser detectadas son aquellas que provocan cambios en el procesamiento del ARNm (ARN mensajero), conocidas como mutaciones de *splicing* y generalmente localizadas en regiones intrónicas flanqueantes (±2 pb del exón).

Las mutaciones de tipo *nonsense*, *frameshift* y de *splicing*, se definen, en conjunto, como mutaciones nulas o de pérdida de función (del inglés, Loss-of-function; LoF) y son consideradas, *per se*, como potencialmente patogénicas.

Los primeros casos en los cuales se utilizó esta tecnología con fines diagnósticos, demostraron que en pacientes con trastornos complejos del neurodesarrollo y en casos en los cuales se creía que la etiología subyacente era genética, la aplicación de esta tecnología resultó ser de gran utilidad[242], publicándose en varios estudios, que la secuenciación de exomas incrementa significativamente la habilidad diagnóstica alcanzando una tasa de rendimiento próxima al 30%[243-245]. Rendimiento que, además, se cree que aumentará con el paso de los años, a medida que el conocimiento acerca del genoma humano se agudice y se conozcan nuevas relaciones gen-enfermedad[246].

Desde su incorporación a la práctica clínica, se ha podido comprobar que la secuenciación de exomas supone una herramienta efectiva en el diagnóstico genético de enfermedades muy heterogéneas. Igualmente, se ha descrito como una herramienta valiosa a la hora de proporcionar evidencias acerca de la posible expansión de los fenotipos asociados con enfermedades humanas ya conocidas e identificar nuevos genes candidatos asociados a las mismas[244]. Es necesario tener en cuenta que uno de los principales inconvenientes de la aplicación de la

secuenciación de exomas en este campo, es que la validación clínica de un nuevo gen candidato requiere una gran cantidad de evidencias[247,248]. Y en efecto, algunos autores plantean la idea de que el descubrimiento y caracterización de nuevos genes asociados a enfermedades, será la próxima gran revolución de la genética molecular[235].

Por ello, algunos grupos han planteado la necesidad de reanalizar y reclasificar, tras un período de tiempo todavía no consensuado, todos aquellos casos que no obtienen un diagnóstico molecular y que reciben un resultado negativo después de aplicar la secuenciación de exomas como herramienta diagnóstica[247,248].

Al mismo tiempo, existen una serie de beneficios a la hora de reportar bibliográficamente nuevos genes candidatos como pueden ser la búsqueda y seguimiento de pacientes de alto riesgo y sus familias, la identificación de nuevos síndromes de predisposición a cáncer y el desarrollo de conexiones diagnósticas entre el personal puramente clínico y los perfiles más científicos[242]. A lo cual hay que añadir, la posibilidad de reanalizar los datos ajustándose a las nuevas relaciones gen-enfermedad descritas, esperando que con el tiempo y en presencia de literatura consistente, la mayor parte de los pacientes con resultado inicial negativo obtengan su diagnóstico molecular definitivo[248].

C1. 1.3.1.3.1 Secuenciación de exomas en cáncer

En cuanto a la utilidad de la secuenciación de exomas y su rendimiento en el estudio de la sospecha clínica de la existencia de una predisposición genética frente al cáncer, o al diagnóstico de pacientes con una sospecha clara de padecer un cáncer hereditario, ha sido menos estudiado en comparación a su aplicación en otro tipo de patologías[242]. En los últimos años, se ha visto que el uso de paneles de genes ha incrementado el entendimiento de la comunidad científica a la hora de diagnosticar casos de cáncer hereditario, con tasas de rendimiento diagnóstico situadas entre el 3% y el 16% dependiendo del tipo de cáncer y cohorte de pacientes estudiados[249]. Pero el uso de estos paneles no siempre permite la identificación de la etiología genética de los distintos tipos de cáncer hereditario, motivo por el cual algunos clínicos han comenzado a recurrir al uso de la secuenciación de exomas para tratar de identificar las variantes germinales causales[242].

C1. 1.4 ETAPAS DEL PROCESO DE SECUENCIACIÓN

El proceso de secuenciación masiva requiere diferentes etapas que combinan la selección y preparación del ADN que interesa secuenciar, el proceso de secuenciación propiamente dicho, así como el análisis bioinformático de los datos obtenidos (Figura 9).

C1. 1.4.1 Aspectos técnicos

El primer paso a seguir para llevar a cabo cualquier protocolo de NGS, independientemente del tipo de tecnología empleada, es la **preparación de las librerías** a partir del ADN de interés. Las librerías constituyen conjuntos de moléculas de ADN que contienen únicamente las regiones genómicas que interesa secuenciar. Y su preparación comienza con la fragmentación de las moléculas del ADN del paciente en pequeños fragmentos a los que, tras igualarles los extremos, se les unen unos adaptadores que permiten su posterior amplificación. Los fragmentos que contienen las regiones de interés, son hibridados a sondas unidas a un sistema de selección que pueden ser de distinta naturaleza (bolas magnéticas etc). Así, posteriormente, el ADN de interés puede ser aislado del resto de ADN no deseado y, una vez eliminadas las moléculas de selección, obtenemos la librería que contiene sólo las regiones que interesa secuenciar. Algunas de las tecnologías disponibles hoy en día en el mercado, utilizan métodos de enriquecimiento de las regiones de interés basados en la captura mediante hibridación con sondas dirigidas hacia regiones concretas del genoma. Otras, se basan en la amplificación por PCR de las regiones de interés mediante la unión de cebadores específicos.

El siguiente paso, consiste en el proceso de **secuenciación** propiamente dicho. La mayor parte de las tecnologías de NGS utilizan un sistema de secuenciación por síntesis, es decir, las secuencias se obtienen por medio de la replicación del ADN muestral, un proceso durante el cual se libera algún tipo de señal que permite identificar cuáles son las bases añadidas en cada paso.

C1. 1.4.2 Análisis bioinformático, filtrado y priorización de variantes genéticas

Una vez obtenidas las secuencias de interés comienza el **análisis bioinformático** de los datos obtenidos, una enorme sucesión de pequeñas secuencias solapantes, que dependiendo de la tecnología utilizada presentan tamaños muy diversos. Los fragmentos resultantes se ordenan para obtener la secuencia completa y para ello, son alineados con una secuencia de referencia. Luego, se procede a la detección de las variantes y mediante distintas herramientas bioinformáticas, estas son enumeradas y asociadas a una descriptiva que incluye datos como la región genómica en la cual se localiza, el grado de conservación de esa posición en las distintas especies, su asociación con algún tipo de enfermedad, su presencia en bases de datos poblacionales o clínicas o el potencial efecto de la variante sobre la función de la proteína en base a diferentes predictores bioinformáticos de patogenicidad *in silico*.

Finalmente, el listado obtenido de variantes es sometido a diferentes **estrategias de cribado o filtrado** según factores como la calidad de secuenciación, la frecuencia de la variante en la población o el modelo de herencia sospechado para la patología en estudio, entre otros. Se obtiene un gran número de variantes genéticas por exoma secuenciado, de manera que, para distinguir las variantes patogénicas entre los miles de falsos positivos, es necesario establecer criterios de selección que nos permitan descartar todas las variantes que no resulten de interés[237]. Así, la frecuencia de las variantes en la población, es un criterio importante de selección de las mismas, pues, en el caso de enfermedades raras como las mendelianas o variedades poco comunes de cáncer con sospecha de susceptibilidad genética en la población general, cabe esperar que la frecuencia poblacional de las variantes sea muy reducida o que incluso no hayan sido descritas previamente. Especialmente cuando existe o se sospecha de un modelo de herencia dominante. Para el estudio de la frecuencia de las variantes, puede recurrirse a la información de bases de datos genéticas poblacionales; repositorios, generalmente públicos, donde se encuentra depositada la información correspondiente a la variabilidad del genoma humano en las distintas poblaciones (Tabla 4).

BASE DE DATOS POBLACIONAL	DESCRIPCIÓN
dbSNP https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	Repositorio de variantes puntuales de longitud reducida (≤50pb). Puede contener variantes patogénicas y en ocasiones carece de información acerca de los estudios originales.
dbVar https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/	Contempla variación estructural (generalmente alteraciones de >50pb) procedente de múltiples fuentes.
1000 Genomes Project database https://www.internationalgenome.org/	Variantes procedentes de la secuenciación de 26 poblaciones diferentes. La información es muy diversa, pero puede contener datos de individuos relacionados.
Exome Aggregattion Consortium (ExaC)	Base de datos de variantes procedentes de la secuenciación de 61486 exomas, de individuos no relacionados, procedentes de estudios genéticos de diferentes patologías y poblacionales. Se excluyeron del estudio pacientes pediátricos con patologías e individuos relacionados.
Exome Variant Server (EVS) https://evs.gs.washington.edu/evs**/**	Variantes recolectadas de la secuenciación de exomas en grandes cohortes de individuos de diferentes poblaciones. Incluye los datos de cobertura, permitiendo identificar la ausencia de variación.
The Genome Aggregation Database (GnomAD) https://gnomad.broadinstitute.org/	Colección de las variantes genéticas detectadas en el estudio de 125 748 exomas completos y 15 708 genomas completos. Presenta datos de cohortes distintas (no-cáncer, control etc).

Tabla 4: Resumen de las principales bases de datos poblacionales (Tabla adaptada de Richards et al.2015[250]).

Del mismo modo, es necesario adaptar el cribado de las variantes a la penetrancia esperada, es decir, a la proporción de la población que expresa un fenotipo específico entre todos los individuos que presentan un genotipo concreto. Ya que, por ejemplo, si se espera un modelo de penetrancia incompleta es posible que no existan variantes comunes y exclusivas de los individuos afectados por una patología concreta, y en este caso el filtrado aplicado a las variantes, debe ser menos exhaustivo.

El cribado finaliza con la **priorización e interpretación**, una etapa en la cual se determina qué variantes se relacionan con una mayor

probabilidad con el fenotipo en estudio. Deben ser seleccionadas aquellas que reúnan el mayor número de indicios de ocasionar un impacto funcional en la proteína o que tengan un efecto deletéreo sobre genes implicados en alguna ruta importante relacionada con la enfermedad. Así, es posible eliminar de entrada variantes sinónimas, o aquellas situadas en regiones intrónicas o puntos de regulación como 3'UTR y 5'UTR[250]. Una estrategia inicial lógica de priorización de las variantes, consiste en seleccionar aquellas que se sitúen en genes ya relacionados con la patología en estudio. Además, las proteínas implicadas en una enfermedad tienden a interactuar físicamente entre ellas, por lo que otra posible estrategia de priorización puede resultar del estudio de variantes situadas en genes que interaccionan con otros ya implicados en el fenotipo a estudiar. Igualmente, puede ser útil el conocimiento de las rutas de señalización vinculadas a la enfermedad, para priorizar los genes cuya función biológica esté relacionada con dichas vías[237].

En el contexto clínico, para algunas patologías existen guías específicas para la interpretación del posible efecto de las variantes genéticas. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, se recurre a seguir las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (del inglés, American College of Medical Genetics and Genomics; ACMG). Unas guías destinadas a fomentar el empleo de una terminología estandarizada para la clasificación de las variantes de acuerdo a criterios de patogenicidad en la comunidad científica. Así, las variantes pueden ser categorizadas como benignas, probablemente benignas, de significado incierto, probablemente patogénicas o patogénicas[250]. Dichos criterios, así como las clasificaciones sugeridas en base a los mismos, se resumen en las tablas 5-7.

Además, existen numerosas bases de datos clínicas, algunas de ellas específicas de enfermedad donde se recogen variantes detectadas en pacientes que suelen incluir una clasificación de las mismas en cuanto a patogenicidad (Tabla 8).

Evidencia	Categoría
Muy alta	**PVS1**.Variantes que llevan a un producto génico truncado o no funcional; *nonsense*, *missense* en sitios canónicos de *splicing* (±1 y ±2pb), variantes en el codón de inicio de la transcripción, variantes que conducen a la deleción de uno o varios exones. A tener en cuenta: - Hay variantes nulas no patogénicas en algunos genes. - Las variantes nulas en el extremo terminal 3' deben ser interpretadas cuidadosamente. - Interpretación cuidadosa de las variantes de *splicing.* Recurrir a análisis de ARNm o del producto proteico para su interpretación. - Puede haber múltiples tránscritos con distinto patrón de expresión entre tejidos.
Alta	**PS1**.La variante provoca un cambio al mismo aminoácido que otra variante ya descrita como patogénica. **PS2.**Variante *de novo* en un paciente con la enfermedad y sin historia familiar para la misma. **PS3.**Estudios funcionales *in vitro* confirman la patogenicidad de la variante detectada. **PS4.**La prevalencia de la variante detectada es significativamente mayor en individuos afectos que en población control.
Moderada	**PM1**.La variante se sitúa en un dominio funcional crítico para la proteína sin que se hayan descrito variantes benignas que impliquen al mismo. **PM2.**Variante nunca detectada en población control, o detectada en frecuencias extremadamente reducidas si se estudia una enfermedad recesiva. **PM3.**Variante en *trans* respecto a una variante patogénica en trastornos autosómicos recesivos. **PM4.**La variante provoca un cambio en la longitud de la proteína debido a una deleción o inserción en una región no repetitiva. **PM5.**Variante *missense* en una posición donde otra variante *missense* distinta ha sido descrita como patogénica. **PM6**.La variante se presume *de novo* pero sin confirmación en los progenitores.
Sugestiva	**PP1.**Variante que cosegrega con la enfermedad en una familia con varios miembros afectos y localizada en un gen ya implicado en la enfermedad. **PP2**.Variante *missense* en un gen con pocas variantes benignas de este tipo y con variantes *missense* descritas como patogénicas. **PP3.**Numerosas predicciones *in silico* de patogenidad indican que la variante es patogénica. **PP4.**Fenotipo del paciente o historia familiar muy específico de una enfermedad con una etiología genética simple. **PP5.**Variante recientemente reportada como patogénica por una entidad acreditada, aunque sin evidencia disponible para ello.

Tabla 5: Evidencias de patogenicidad y sus correspondientes categorías para una

variante genética, de acuerdo a los criterios establecidos en las guías ACMG. Abreviaturas: PVS1: pathogenic-very-strong; **PS1-PS4:** Pathogenic-strong; **PM1-PM6:** Pathogenic-moderate; **PP1-PP5:** Pathogenic-supporting. (Tabla adaptada de la original publicada en Richards et al., 2015[250]).

Evidencia	Categoría
Suficiente	**BA1.**MAF>5% en bases de datos poblacionales.
Alta	**BS1.**MAF superior a lo esperado para la enfermedad. **BS2.**Variante observada en individuos sanos en trastornos autosómicos dominantes (heterocigosis), recesivos (homocigosis), ligados a cromosoma X (hemicigosis), con alta penetrancia. **BS3.**Estudios *in vivo/in vitro* han confirmado que la variante es benigna. **BS4.**La variante no cosegrega con la enfermedad en múltiples miembros afectos de una misma familia.
Sugestiva	**BP1.**Variante *missense* en un gen donde se han descrito como patogénicas variantes con pérdida de función. **BP2:**En trastornos autosómicos dominantes de penetrancia elevada, la variante se localiza en *trans* con una variante patogénica, o se observa en *cis* con una variante patogénica, independientemente del tipo de herencia del trastorno. **BP3.**Deleción o inserción que no provoca cambio en la pauta de lectura y localizada en una región repetitiva del gen sin función conocida. **BP4.**Numerosas predicciones *in silico* de patogenicidad indican que la variante es benigna. **BP5.**Variante detectada en un individuo para el cual ya existe un diagnóstico molecular. **BP6.**Variante recientemente reportada como benigna por una entidad acreditada, aunque sin información disponible todavía de la evidencia para hacerlo. **BP7.**Variante sinónima sin impacto funcional predicho sobre el *splicing*.

Tabla 6: Evidencias y sus correspondientes categorías para clasificar una variante benigna, de acuerdo a los criterios establecidos en las guías ACMG. Abreviaturas: BA1: benign-stand-alone; **BS1-BS4:** bening-strong; **BP1-7:** benign-supporting (Tabla adaptada de la original publicada en Richards et al., 2015[250]).

Clasificación	Combinación de los criterios
Patogénica	**- a.** PSV1 y >1 PS1-PS4 o >2 PM1-PM6 o **- b.** 1 PM1-PM6 y 1 PP1-PP5 o >2 PP1-PP5 **- c.** >2 PS1-PS4 **- d.** 1 PS1-PS4 y >3 PM1-PM6 o 2 PM1-PM6 y >2 PP1-PP5 o 1 PM1-PM6 y >4 PP1-PP5
Probablemente patogénica	**- a.** 1 PVS1 y 1 PM1-PM6 **- b.** 1 PS1-PS4 y 1-2 PM1-PM6 **- c.** 1 PS1-PS4 y >2 PP1-PP5 **- d.** >3 PM1-PM6 **- e.** 2 PM1-PM6 y 2 PP1-PP5 **- f.** 1 PM1-PM6 y >4 PP1-PP5
Benigna	**- a.** BA1 **- b.** >2 BS1-BS4
Probablemente benigna	**- a.** 1 BS1-BS4 y 1 BP1-BP7 **- b.** >2 BP1-BP7
Significado Incierto	Otros criterios no mencionados, o criterios de patogenicidad y benignidad contradictorios.

Tabla 7: Clasificación de las variantes genéticas en base a la combinación de los criterios de patogenicidad y benignidad propuestos en las guías de la de la ACMG. (Tabla adaptada de la original publicada en Richards et al., 2015[250]).

BASE DE DATOS CLÍNICA	DESCRIPCIÓN
ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)	Repositorio de variantes en el que se incluye posible significado clínico y asociación fenotípica de las mismas.
Human Gene Mutation Database (HGMD) (http://www.hgmd.cf.ac.uk)	Colección de variantes genéticas con significado clínico derivadas de la bibliografía científica.
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (https://www.omim.org/)	Base de datos de genes y enfermedades humanas de base genética con repositorio de variantes genéticas asociadas a patologías concretas. Incluye la descripción de unos 1500 genes con significado clínico en humanos y unos 5000 fenotipos clínicos.
DECIPHER (https://www.deciphergenomics.org/)	Base de datos de alteraciones citogenéticas para clínicos e investigadores, que unifica la información genética procedente de estudios con *microarrays* con datos fenotípicos.

Tabla 8: Resumen de las principales bases de datos clínicas disponibles para su consulta en los estudios de genética clínica (Tabla Adaptada de Richards et al. 2015[250]).

Por otro lado, las variantes de cambio de aminoácido (*missense*), pueden priorizarse de acuerdo a las indicaciones de predictores bioinformáticos de patogenicidad e incluso al tipo de dominio proteico al que afectan. Una vez seleccionadas la variante o variantes de interés, la situación ideal supone el desarrollo de estudios posteriores, típicamente funcionales, para confirmar su papel en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, en la mayor parte de los laboratorios este último paso resulta imposible dado el incremento continuo del empleo de la secuenciación masiva, que conlleva la detección de un número muy elevado de nuevas variantes.

C1. 1.4.2.1 Herramientas bioinformáticas de predicción *in silico* de patogenicidad

En la actualidad, hay disponibles una gran cantidad de herramientas que permiten predecir de manera computacional el posible impacto de una variante genética sobre la proteína y que son empleados a menudo en los estudios genéticos clínicos. Esta situación se debe a que, en la práctica clínica, resulta muy complicado poder llevar a cabo estudios funcionales para cada una de las variantes que se consideren relevantes.

Las herramientas de predicción *in silico* se emplean, mayoritariamente, para predecir el posible efecto de variantes de tipo *missense* y variantes *de splicing* a nivel proteico. Y, aunque la mayor parte de las herramientas disponibles combinan diferentes aspectos, los dedicados a la predicción del efecto de variantes *missense*, suelen valorar el grado de conservación entre especies del nucleótido y aminoácido afectados, así como las posibles consecuencias bioquímicas del cambio. Mientras que las dedicadas a la predicción de variantes de *splicing*, predicen la creación o eliminación de sitios de empalme a nivel exónico o intrónico. A continuación, se describen algunos de los predictores más empleados en la actualidad:

- **CADD** (del inglés, Combined Annotation Dependent Depletion, https://cadd.gs.washington.edu/): es una herramienta para puntuar la nocividad de las variantes de un solo nucleótido e inserciones/deleciones en el genoma humano. Integra múltiples

anotaciones en una métrica mediante el contraste de variantes que superaron el efecto de la selección natural con variantes simuladas. El resultado de la predicción se define mediante lo que se denomina el *c-score*. A mayores valores de *c-score* mayor potencial deletéreo de los alelos estudiados.

- **SIFT** (del inglés, Sorting Intolerant From Tolerant, http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html): algoritmo que permite conocer cuál sería el potencial efecto de la sustitución de un aminoácido en la proteína en base a la homología de secuencias y las propiedades físicas de los aminoácidos. Permite clasificar a los cambios de tipo *missense* como patogénicos o neutrales. Para considerar como patogénica una variante, el score de SIFT debe ser inferior a 0,05.
- **Polyphen2** (del inglés, Prediction of Funtional Effect of Human nsSNPs, http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/): herramienta que predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína humana, empleando consideraciones físicas y comparativas directas. La predicción de patogenicidad se basa en tres aproximaciones; caracterización de la secuencia donde se produce la sustitución, grado de conservación de la sustitución proteica y posible alteración de la estructura tridimensional de la proteína. Los valores que indican patogenicidad o neutralidad en esta herramienta oscilan entre 0 y 1. Las variantes con un score superior a 0,85 se consideran como patogénicas.
- **DANN** (del inglés, Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks[251]): es una metodología de puntuación de patogenicidad diseñada en la Universidad de California y basada en redes neuronales profundas. Las puntuaciones aportadas por este algoritmo oscilan entre 0 y 1, siendo los valores más próximos a la unidad los que indicarían un mayor grado de patogenicidad. Habitualmente, suele tomarse 0,995 como punto de corte para detección de variantes no sinónimas con efecto potencialmente deletéreo sobre la proteína sintetizada.

- **LRT** (del inglés, Likelihood Ratio Test; http://www.genetics.wustl.edu/jflab/lrt_query.html): algoritmo que aporta valores del 0 al 1, siendo los valores próximos a 1 indicativos de un mayor riesgo de patogenicidad. Permite la identificación de variantes potencialmente perjudiciales que implican a aminoácidos altamente conservados dentro de las secuencias codificantes de proteínas.
- **GERP++** (del inglés, Genomic Evolutionary Rate Profiling, http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html) indica la puntuación que se relaciona con el grado de conservación, empleando comparaciones de los genomas de 35 mamíferos. Los valores se extienden desde -12,3 hasta 6,7, siendo este último valor el que indica mayor grado de conservación. De acuerdo con este algoritmo, tendrán una mayor patogenicidad los cambios que impliquen a una posición altamente conservada.
- **REVEL** (del inglés, Rare Exome Variant Ensemble Learner) es un meta-predictor que incorpora los resultados procedentes de otros algoritmos de predicción *in silico*. Los valores obtenidos para este algoritmo oscilan entre 0 y 1, siendo los más cercanos a la unidad los que indicarían una mayor probabilidad de patogenicidad. Los autores que desarrollaron este algoritmo, indicaron que más del 75% de las variantes patogénicas presentan valores por encima de 0,5[252].
- **dbscSNV_ADAScore** (del inglés, Database *splicing* consensus Single Nucleotide Variant), una base de datos que incluye todas las variantes (aproximadamente 15 millones) localizadas en las regiones de consenso de empalme (-3 a +8 en el sitio de empalme 5' y -12 a +2 en el sitio de empalme 3'). Este modelo de predicción se construyó a partir de 7 herramientas de predicción de SNVs que alteran el sitio de empalme ya desarrolladas.

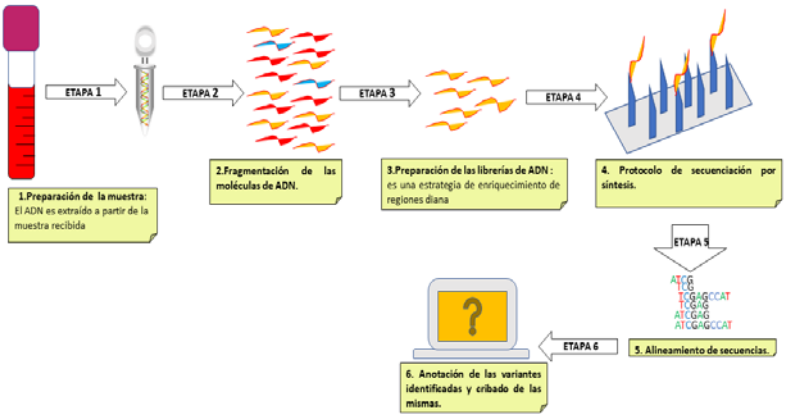


Figura 9*:* Esquema general representativo de las distintas etapas del proceso de secuenciación masiva. Se muestra desde el procesado de la muestra problema, hasta la obtención de las variantes genéticas de interés, utilizando un protocolo de secuenciación por síntesis o replicación de las regiones de interés a estudiar (Imagen de creación propia).

C1. 1.4.3 Validación clínica de las asociaciones gen-enfermedad

De acuerdo a lo mencionado en apartados anteriores, la secuenciación de exomas se ha trasladado en un corto período de tiempo desde el dominio de la investigación hasta el área más puramente clínica. Y durante la última década, se ha podido observar la continua mejora y estandarización de los criterios de patogenicidad necesarios para reportar clínicamente las variantes genéticas identificadas[250,253].

El diagnóstico molecular mediante secuenciación de exoma, ha hecho necesaria la existencia de un sistema de protocolos o guías estandarizado para la caracterización genética; un sistema de validación clínica. Ya que a pesar de que el número de asociaciones gen-enfermedad se ha incrementado exponencialmente en los últimos años, todavía hay muchas por descubrir. De hecho, algunos autores como Cooper et al. o Chong et al. han sugerido, respectivamente, que todavía hay entre unos 5 000-10 000 y unos 9 000 genes sin descubrir [254,255]. Pero es necesario tener en cuenta que el cálculo de dichas estimaciones es complicado debido a la gran heterogeneidad genética y pleiotropía existente[248].

Por todo ello, el mayor reto que existe en la actualidad en un laboratorio de genética clínica es interpretar la validez clínica de una asociación gen-enfermedad, definida por algunos autores como:

> "la determinación de que una enfermedad concreta es verdaderamente causada por variantes en un gen concreto y que la variante que ha sido detectada es realmente patogénica"[246].

Antes de determinar si una variante es o no patogénica, es necesario evaluar si un gen tiene la suficiente evidencia para apoyar su implicación en una enfermedad concreta. De ser así, se dice que el gen está caracterizado[248]. Así, los laboratorios de diagnóstico tienen una necesidad urgente de un sistema de puntuación que pueda ser utilizado para evaluar de manera sistemática las evidencias tanto para el descubrimiento de nuevos genes como de asociaciones gen-enfermedad previamente descritas. Para ello, Smith et al. han propuesto un sistema de puntuaciones basado en discriminar si existe o no suficiente evidencia para considerar un gen como caracterizado para una enfermedad en particular. Esta metodología de clasificación, se basa en la asignación de puntos basados en los criterios que se adjuntan en la tabla 9[248].

En este sistema de puntuación, cada categoría de evidencia permite un número máximo de puntos. Puntos que se suman para una asociación gen-enfermedad única, con el objetivo de determinar el nivel de validación clínica. De manera que, la suma de todos los puntos es comparada con una escala categórica preestablecida, pudiendo obtenerse cuatro niveles posibles de validación. Cuando el sumatorio total ubica al gen en las categorías "sin evidencia" o "evidencia limitada", se considera que el gen candidato no está caracterizado. Por otro lado, cuando existe una "evidencia moderada", "fuerte" o "definitiva", se establece que la etiología genética de la patología en estudio está caracterizada[248] (Figura 10, Tabla 9).

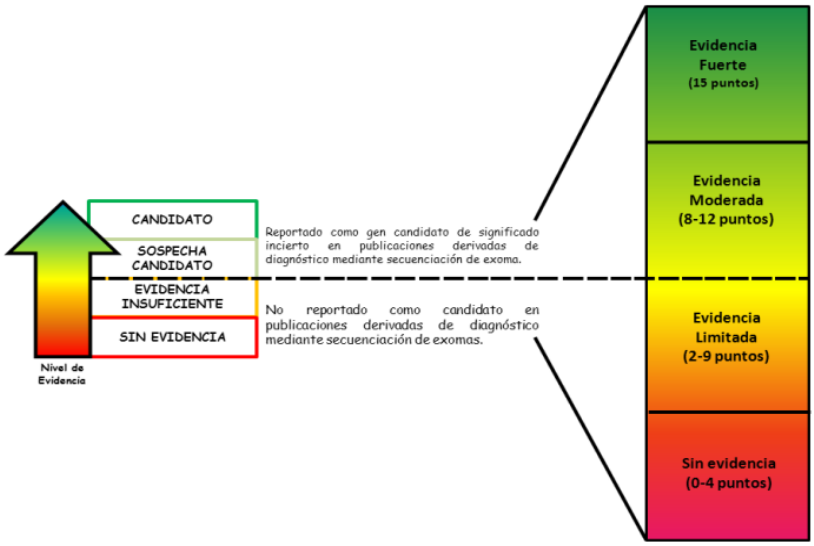
En un estudio previo, Farwell Hagman et al, propusieron una estrategia de identificación de genes candidatos específica de paciente y utilizada, también, para determinar el nivel de evidencia experimental

disponible para proponer una asociación gen-enfermedad candidata. Esta estrategia se centra no sólo en la evidencia de que las variantes identificadas sean potencialmente deletéreas para la función de la proteína codificada por el gen en estudio, sino también en su patogenicidad respecto a la enfermedad en estudio[247]. Utiliza por ello, una combinación de la clasificación de la propia variante, con datos experimentales de apoyo.

Para reportar un gen como "candidato" o "sospecha de candidato", la cantidad de datos experimentales que apoyan esta idea debe ser significativa y entre estos datos se incluyen otros pacientes reportados previamente, modelos animales, síndromes de microdeleción y/o microduplicación humanos que incluyen genes de interés, la función del gen en estudio, su patrón de expresión y la co-localización o interacción con los productos o genes de interés que causen fenotipos similares.

Para Farwell Hagman et al., un gen "candidato" o una "sospecha de candidato", no puede ser propuesto sólo en base a la naturaleza potencialmente deletérea de la alteración detectada, y más teniendo en cuenta que en la bibliografía se ha estimado que en individuos sanos se detectan una media de 300 variantes raras, unas 31 variantes potencialmente patogénicas y una variante *de novo* con efecto truncante sobre una proteína concreta, por exoma secuenciado[254,256,257].

No obstante, independientemente de su clasificación como genes candidatos o genes no caracterizados, Farwell et al. proponen reportar todos los hallazgos obtenidos en un exoma y publicarlos en bases de datos clínicas como ClinVar[247,258], ya que esta información podría ser de utilidad para futuras reclasificaciones a medida que la información disponible en la bibliografía acerca de un gen concreto se va incrementando.



Categoría de evidencia	PUNTOS
Número de pacientes no relacionados: 1 punto:1-2; 2 puntos:3-4; 3 puntos:5-9; 4 puntos:10-24 pacientes	1-4
Otras evidencias estadísticas: 1 punto: patología autosómica dominante (AD) con exceso significativo de casos de novo 1 punto: patología autosómica recesiva (AR) con un LOD score>3	0-1
Número de publicaciones reportando portadores independientes: 1 punto por publicación	0-3
Número de variants patogénicas: 1 punto por variante patogénica o probablemente patogénica	0-4
Función del gen: 1 punto si la función/expresión es consistente con la enfermedad 1 punto si interactúa físicamente con algún gen asociado a enfermedad	0-2
Alteración del gen: 1 punto si da lugar a una patología relevante in vitro después de una alteración similar 1 punto por la determinación del mecanismo mutacional	0-2
Organismo modelo: 1 punto si la función del gen in vivo, está relacionada con la patología humana 1 punto si tanto el fenotipo como el genotipo encajan con la enfermedad humana	0-2

Figura 10, Tabla 9: Sistema de puntuación para la validación clínica de una asociación gen-enfermedad en base a diferentes evidencias experimentales. Las alteraciones genéticas situadas en genes que no muestran una evidencia suficiente para apoyar relevancia clínica, se describen como "genes no caracterizados con escaso nivel de evidencia". (Imagen y tabla adaptada de Farwell Hagman et al.2016; Smith et al.2017 y Strande et al. 2017)[247,248,259].

C1. 2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

C1. 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo fundamental del capítulo 1 de esta tesis doctoral consistió en la búsqueda de la existencia de una predisposición genética germinal en pacientes con melanoma uveal bilateral primario. Los pacientes seleccionados, no presentaron historia familiar de melanoma uveal ni tampoco historia de otros tipos de cáncer (incluido melanoma maligno cutáneo). Por ello, se presupuso la aparición de mutaciones en algún gen/genes todavía no identificados de predisposición germinal frente a esta patología.

El estudio se centró en la búsqueda de variantes genéticas de alta penetrancia en nuevos genes candidatos a explicar la posible existencia de una predisposición para esta enfermedad, con el objeto final de ampliar el conocimiento científico y clínico de esta entidad y posibilitar la inclusión de los resultados derivados de este estudio en los programas de diagnóstico genético predictivo para MU.

C1. 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudio de la presencia de mutaciones germinales en el gen *BAP1* y en otros genes de predisposición a melanoma en pacientes afectados de melanoma uveal bilateral primario.
- Identificación de nuevos genes de predisposición a melanoma uveal mediante técnicas de secuenciación masiva; estudio de paneles y exomas dirigidos.
- Búsqueda de variantes genéticas raras de alta penetrancia compartidas en los cuatro pacientes, no relacionados, afectados de melanoma uveal bilateral primario incluidos en el estudio.
- Estudio del posible grado de implicación de la/las variantes/s genéticas detectadas en relación al fenotipo en estudio.
- Determinación de la posible existencia de nuevas vías de señalización relacionadas con la aparición del MU.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C1. 3. MATERIALES Y MÉTODOS

C1. 3.1 COHORTE DE PACIENTES

El estudio fue llevado a cabo en 4 pacientes diagnosticados y tratados de MUB en la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto (URQTIA) del servicio de oftalmología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS-SERGAS) (Reconocida como Unidad de Referencia por el Ministerio de Sanidad según el RD 1302/2006, Resolución del 26 de diciembre de 2008 para designar Centros, Servicios y Unidades de Referencia en el Sistema Nacional de Salud) entre los años 2001-2018 y a lo largo de aproximadamente 30 años de experiencia en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de pacientes con MU.

El trabajo se ejecutó con aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC-G) bajo el dictamen del 28 de febrero de 2019, en el cual se declara la conformidad del comité con la enmienda solicitada de inclusión de este estudio en el proyecto "Detección y evaluación de biomarcadores pronósticos en el melanoma uveal", con código de registro 2009/128 (ANEXO IV y V).

El diagnóstico clínico de estos pacientes fue establecido en base a un examen oftalmológico completo mediante ecografía ocular, utilizando la tecnología ecográfica AVISO^{TM}, Quantel Medical (Clermont-Ferrand, France).

La selección de los pacientes se determinó en base a los criterios de inclusión y exclusión incluidos en la tabla 10.

Pacientes	Inclusión	Exclusión
MUB	Pacientes diagnosticados y tratados en la URQTIA. Pacientes que acudieron a la URQTIA derivados de otros especialistas. Diagnóstico de MUB confirmado por evaluaciones oftalmológicas completas y ecografía ocular estandarizada. Pacientes de origen Caucásico.	No proveer el consentimiento válidamente informado. Presentar antecedentes de otros tipos de cáncer. Metástasis en ojo contralateral no descartada en el momento del diagnóstico. Presentar historia familiar de MU.

Tabla 10: Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes incluidos en el estudio de búsqueda de genes de predisposición a MUB mediante secuenciación masiva.

C1. 3.2 DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

Las características clínicas y demográficas que se detallarán a continuación de cada paciente incluido en el estudio, se resumen en la tabla 11 situada al final de este apartado.

C1. 3.2.1 Paciente 1 (MUB1)

El primero de los pacientes incluidos en el estudio, fue un varón de 80 años de edad, aparentemente sano y de origen caucásico que presentó un MUB en un intervalo de tiempo entre el primer MU y el segundo, de 16 años (Tabla 11). En el año 1997, se le detectó una masa coroidea pigmentada en el cuadrante temporal del ojo izquierdo mediante oftalmoscopia y ecografía ocular, consistente con el diagnóstico de un MU (Figura 11.1).

La valoración clínica del paciente por parte de los especialistas llevó a un tratamiento no conservador, procediéndose a la enucleación del ojo izquierdo. El tumor diseccionado fue estudiado mediante técnicas de anatomía patológica que permitieron confirmar que se trataba de un MU con células de tipo fusiforme (Figura 11.2). Los especialistas de la URQTIA, pudieron recuperar muestra del tumor parafinado del ojo enucleado para incluirla en el estudio genómico.

Posteriormente, en el año 2013, el paciente fue diagnosticado de un MU en el ojo derecho tras una pérdida repentina de agudeza visual. De nuevo, los resultados de las pruebas de imagen llevadas a cabo, retinografía y ecografía ocular, fueron compatibles con el diagnóstico

de un MU situado en el cuadrante inferior. En esta ocasión, el tratamiento llevado a cabo fue conservador, siguiendo un tratamiento de braquiterapia I^{125} (Figuras 11.3 y 11.4). Un año después del tratamiento local del ojo derecho, el paciente falleció tras haber desarrollado metástasis hepática.

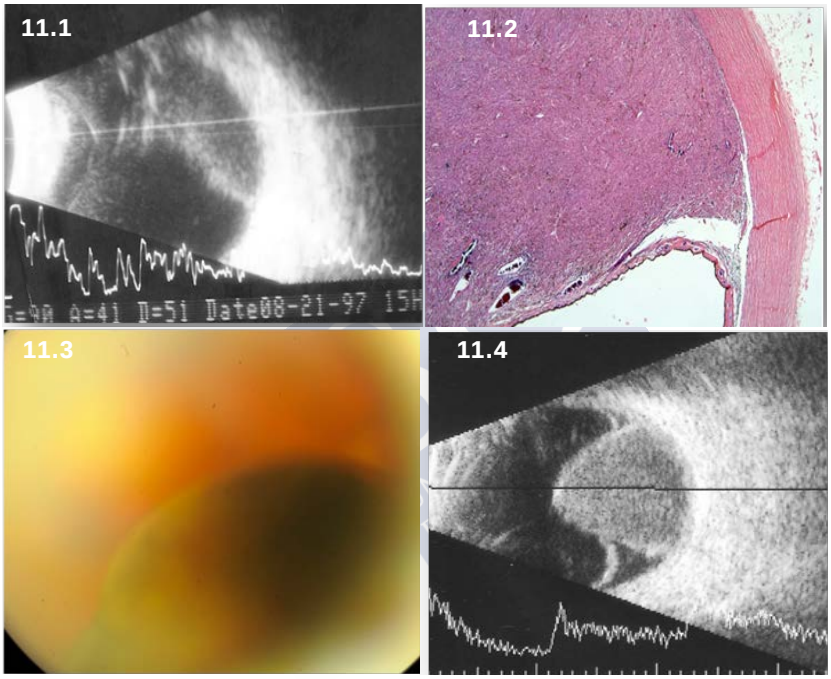


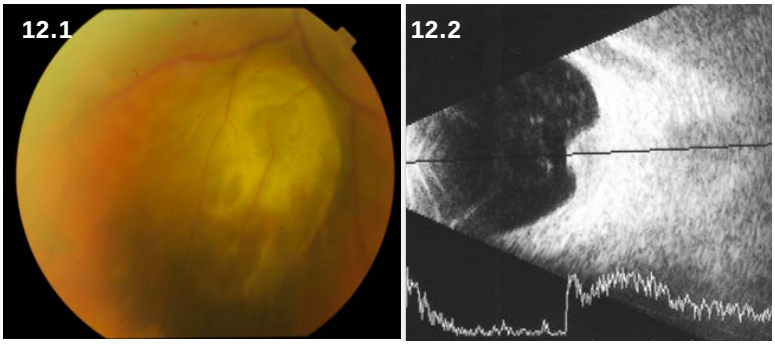
Figura 11: Resultado de las pruebas de imagen correspondientes al diagnóstico de un MUB en el paciente MUB1. (Imágenes proporcionadas por la URQTIA). **11.1)** Ecografía ocular que muestra la presencia de la primera masa coroidea detectada en el ojo izquierdo del paciente MUB1. **11.2)** Corte histológico del MU, obtenido tras enucleación del ojo izquierdo del paciente MUB1. **11.3)** Fondo de ojo derecho, donde se aprecia el MU diagnosticado al paciente en el año 2016. **11.4)** Ecografía ocular correspondiente al ojo derecho del paciente donde se puede apreciar la presencia de un MU de grandes dimensiones.

C1. 3.2.2 Paciente 2 (MUB2)

En segundo lugar, se incluyó en el estudio a un paciente de origen caucásico, varón de 56 años de edad. En esta ocasión, el paciente presentaba otras patologías, entre ellas enfermedad pulmonar obstructiva y había sido recientemente operado de un queratoacantoma situado en el área palpebral inferior izquierda. Ninguna de ellas estaba relacionada con la presencia de un MUB (Tabla 11).

El propio paciente refirió pérdida súbita de agudeza visual en el ojo izquierdo y la presencia de miodesopsias en ambos ojos. De modo que, por medio de una retinografía y ecografía ocular, se le detectó una masa coroidea pigmentada en el ojo izquierdo localizada en el cuadrante nasal inferior y compatible con el diagnóstico de un MU (Figura 12.1 y 12.2) (Tabla 11). Simultáneamente, presentaba una lesión melanocítica de pequeño tamaño en el ojo derecho, situado en una posición inferior a la fóvea. Aunque se trataba de una lesión pigmentada muy plana, mostraba signos propios de un MU como la presencia de pigmento naranja o un rápido crecimiento (Figura 12.3 y 12.4). En este momento, el paciente fue sometido a un cribado diagnóstico específico para la detección de lesiones metastásicas con resultado negativo.

Los especialistas optaron por un tratamiento conservador en ambos ojos, mediante braquiterapia I^{125}, pero el paciente rechazó el tratamiento del melanoma detectado en el ojo derecho, siendo únicamente tratado del ojo izquierdo. En el año 2018, el paciente falleció tras haber desarrollado metástasis hepática.



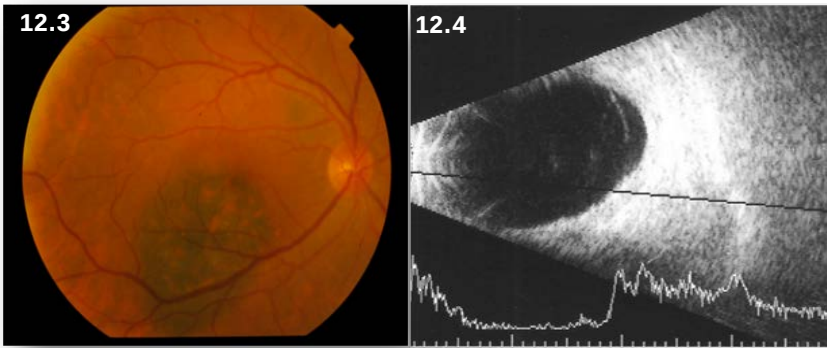


Figura 12: Resultado de las pruebas de imagen correspondientes al diagnóstico de un MUB en el paciente MUB2. (Imágenes proporcionadas por la URQTIA). **12.1)** Fondo de ojo donde se puede apreciar el MU detectado en el ojo izquierdo del paciente**. 12.2)** Resultado de la ecografía ocular realizada sobre el ojo izquierdo, donde puede apreciarse la presencia de un MU situado en el cuadrante nasal inferior. **12.3)** Retinografía correspondiente al ojo derecho del paciente, donde puede apreciarse la presencia de una masa con localización inferior a la fóvea y compatible con el diagnóstico de un melanoma de pequeño tamaño. **12.4)** Ecografía ocular del ojo derecho del paciente MUB2, donde puede apreciarse la presencia de una masa coroidea compatible con el diagnóstico de un melanoma pequeño.

C1. 3.2.3 Paciente 3 (MUB3)

El tercero de los pacientes incluidos en el estudio, se trató de una mujer de origen caucásico de 96 años sin otras patologías de interés en el momento del diagnóstico del MU en el ojo contralateral (Tabla 11).

Esta paciente fue diagnosticada de un MU en el ojo izquierdo 27 años después de haber sido enucleada en otro centro hospitalario, debido a la presencia de un MU en el ojo derecho (pruebas de imagen no disponibles). En ese momento, la paciente ya presentaba una lesión melanocítica en su ojo izquierdo, por el cual fue sometida a seguimiento durante todos los años previos al momento del diagnóstico del MUB.

Los especialistas de la URQTIA, pudieron recuperar muestra del tumor parafinado del ojo enucleado para incluirla en el estudio genómico. Las pruebas de imagen, permitieron detectar que la lesión pigmentaria coroidea situada en la periferia temporal del ojo izquierdo, había experimentado crecimiento durante los 8 meses previos al momento del diagnóstico del nuevo MU. Asimismo, presentaba abundante pigmento naranja, a lo cual había que sumar la existencia de excavación coroidea y ángulo kappa mediante la prueba de

ultrasonidos. Signos todos ellos compatibles con el diagnóstico de un MU (Figura 13). La paciente, rechazó ser tratada del MU diagnosticado en el ojo izquierdo y permanece actualmente a seguimiento por la URQTIA y con rastreo de enfermedad metastásica negativo.

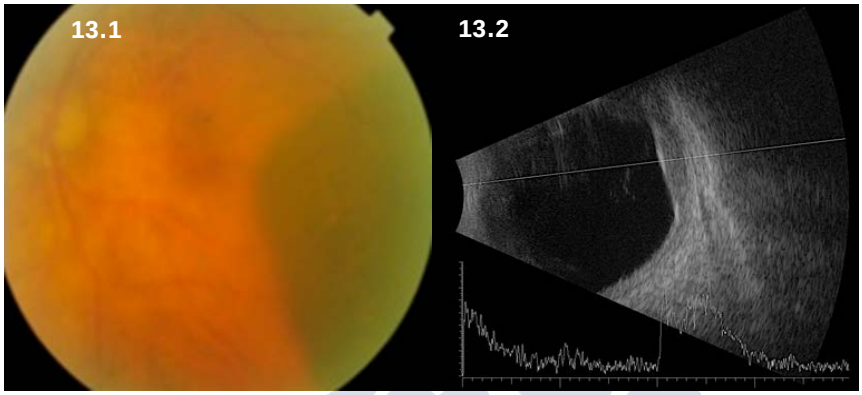


Figura 13: Resultados de las pruebas de imagen realizadas al ojo izquierdo de la paciente MUB3, compatibles con el diagnóstico de un MUB. (Imágenes proporcionadas por la URQTIA). **13.1)** Fondo de ojo izquierdo de la paciente MUB3, donde puede apreciarse la presencia de una masa pigmentaria coroidea situada en la periferia temporal**. 13.2)** Ecografía ocular del ojo izquierdo donde puede apreciarse la presencia de una masa coroidea compatible con el diagnóstico de un MU.

C1. 3.2.4 Paciente 4 (MUB4)

El cuarto y último paciente, se trató de una mujer de origen caucásico con 72 años en el momento del diagnóstico del MUB. La paciente fue derivada en el año 2016 a la URQTIA procedente de otro hospital de la comunidad gallega, para valoración clínica de una lesión melanocítica de gran tamaño situada en el ojo izquierdo y ante la sospecha de un MU (Tabla 11) (Figura 14).

La paciente había sido intervenida en el año 2001 de un melanoma de cuerpo ciliar en el ojo derecho, practicándosele una iridociclectomía. No presentaba otros antecedentes de interés, descartándose antecedentes de melanoma maligno cutáneo, o de otros tipos de cáncer tanto en ella como en otros miembros de la familia.

A día de hoy, permanece a seguimiento por la URQTIA, con una masa coroidea nodular en el ojo izquierdo de estructura interna regular,

reflectividad alta, abundantes drusas y áreas de gliosis en epitelio pigmentario retiniano, pero sin existencia de extensión extraocular. Cabe mencionar que, en febrero de 2019, la paciente fue diagnosticada de un carcinoma primario infiltrante de mama izquierda. Actualmente, muestra resultados de enzimas hepáticas normales, radiografía de tórax y ecografía abdominal sin signos de enfermedad sistémica.

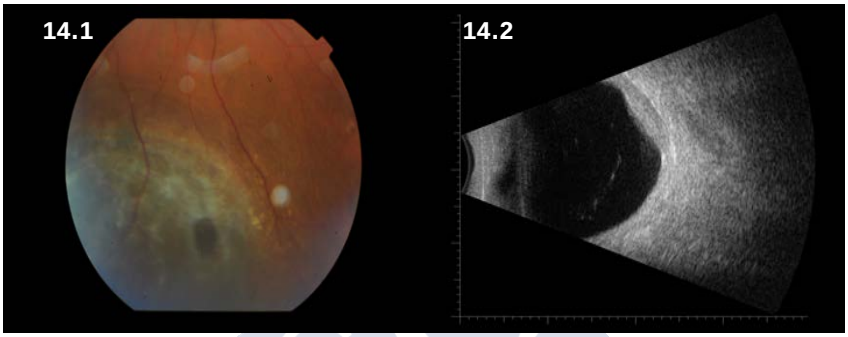


Figura 14: Resultados de las pruebas de imagen de la masa pigmentaria coroidea a estudio en la paciente MUB4. (Imágenes proporcionadas por la URQTIA). **14.1)** Fondo de ojo donde puede apreciarse la presencia de una masa pigmentaria coroidea **14.2)** Ecografía ocular del ojo izquierdo con presencia de una masa coroidea compatible con el diagnóstico de un MU.

ID	EDAD	Sexo	1º Ojo Lat. Loc.	Al (mm)	Bas (mm)	2º Ojo Lat. Loc.	Al (mm)	Bas (mm)	Intervalo (años)	Met
MUB1	80	H	OI, C	-	16	OD, C	15,50	10,92	16	Sí
MUB2	56	H	OI, C	8,62	3,69	OD, C	plano	5,20	5	Sí
MUB3	96	M	OD, C	-	-	OI, C	3,42	15,81	27	No
MUB4	72	M	OD, CC+I			OI, C	1,98	12,69	15	No

Tabla 11: Características clínicas de los pacientes diagnosticados de MUB. Abreviaturas: Id: identificación del paciente; **Lat**: lateralidad; **Loc**.: localización intraocular; **Al:** altura del tumor; **Bas:** base del tumor; **mm**: milímetros; **H:** hombre; **M:** mujer; **OD:** Ojo derecho; **OI:** Ojo izquierdo; **C**: coroides; **I:** iris; **CC**: cuerpo ciliar; **Met**: metástasis.

C1. 3.3 MUESTRAS UTILIZADAS Y OBTENCIÓN DE LAS MISMAS

La muestra biológica principal elegida para llevar a cabo este estudio, fue ADN genómico extraído a partir de muestras de sangre periférica tomadas de los 4 pacientes de MUB incluidos en el estudio.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por medio del personal de la URQTIA después de que los pacientes firmasen el consentimiento informado para llevar a cabo el estudio genómico (ANEXO VI). Posteriormente, fueron remitidas a la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX) situada en el CHUS, donde se extrajo y purificó el ADN genómico.

Para la extracción de ADN, se empleó la tecnología Chemagic DNA Blood100 Kit (Chemagic Magnetic Separator Module 1, Perkin Elmer). El sistema CHEMAGEN®, se trata de un robot para la extracción automatizada de ADN a partir de sangre total, utilizando para ello partículas magnéticas que permiten obtener una gran concentración de ADN de elevada pureza. Se siguieron las instrucciones proporcionadas por la casa comercial.

Asimismo, se incluyeron en el estudio muestras de ADN tumoral procedentes de fragmentos tumorales parafinados del primer MU diagnosticado en los pacientes MUB1 y MUB3, que fueron recuperadas de los bancos de muestras de los servicios de anatomía patológica del CHUS y el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), respectivamente.

El ADN tumoral fue extraído a partir de las muestras parafinadas utilizando el kit de extracción de tejidos parafinados de Quiagen (GeneRead DNA FFPE Kit) y de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. No obstante, el ADN obtenido no presentó la calidad requerida para poder ser sometido a la secuenciación de exomas dirigidos, por encontrarse altamente fragmentado.

C1. 3.4 PANEL DE GENES DE PREDISPOSICIÓN A MELANOMA

Inicialmente, para el primero de los pacientes incluidos en el estudio (MUB1), antes de que se configurase la cohorte de 4 pacientes con MUB, se llevó a cabo una estrategia de NGS dirigida a regiones específicas del genoma basada en el diseño de un panel de genes mediante la herramienta SureDesign (Agilent) y en el cual se incluyeron algunos de los principales genes implicados en la predisposición a melanoma. La lista completa de genes incluidos en el panel y una breve descripción de los mismos se detallan la tabla 12 adjunta a continuación.

GEN	LOCUS	OBSERVACIÓN
CDKN2A	9p21	• Frecuentemente mutado o delecionado en una amplia variedad de tumores. • Se sabe que es un importante gen supresor de tumores • Predisposición a **Melanoma Uveal**
CDK4	12q14	• Codifica para una quinasa responsable de la fosforilación del producto de expresión del gen Rb. • Predisposición a **Melanoma Uveal**
MC1R	16q24.3	• Codifica para una proteína conocida como *receptor de melanocortina-1.* • Polimorfismos relacionados con el color del pelo y la piel • Predisposición a **Melanoma Uveal**
XRCC3	14q32.3	• Codifica para una proteína implicada en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y reparación del DNA • Predisposición a **Melanoma Uveal**
MITF	3p13	• Codifica para un factor de transcripción que regula la diferenciación y el desarrollo de los melanocitos del epitelio pigmentario retiniano • Predisposición a **Melanoma Uveal**
TERT	5p15.33	• Codifica para la enzima telomerasa • Desregulación implicada en procesos de oncogénesis • Predisposición a **Melanoma Uveal**
BAP1	3p21	• Codifica para una enzima de unión a la proteína codificada por el gen BRCA1. Implicada en regular la transcripción, el ciclo celular, el crecimiento celular, respuesta a daños en el DNA y dinámica de la cromatina • Predisposición a **tumores en general**

Tabla 12*:* Lista de genes incluidos en el panel diseñado para el estudio de predisposición frente a melanoma.

El proceso de secuenciación fue llevado a cabo por el personal del servicio de secuenciación masiva de la FPGMX, mediante la plataforma de secuenciación IonTorrent Personal Genome Machine (PGM) System (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA).

Se secuenciaron los exones de todos los genes incluidos en el panel, así como las regiones intrónicas adyacentes (±10 pb). Para la captura de las regiones de interés se utilizó el kit SureSelect^{XT} enrichment (Agilent). Estos kits, incluyen todos los reactivos necesarios para la preparación de la librería, la hibridación y la captura de las regiones de interés.

Para llevar a cabo el protocolo de secuenciación, se partió de una cantidad mínima inicial de ADN genómico del paciente MUB1 de 50 ng totales. Para lo cual fue necesario medir previamente, la concentración del ADN genómico obtenido tras la extracción a partir de sangre periférica, utilizando el método de medición por espectrofotometría Qubit®, dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA).

Los datos obtenidos tras el proceso de secuenciación, fueron analizados por los bioinformáticos de la FPGMX mediante las herramientas bioinformáticas: TMAP 4.4.11, TVC 5.0-7, GATK v3.4-46, Picard 1.136, BEDTools v2.25.0, SAMTools 1.2, ExomeDepth 1.1.5 y ANNOVAR 2015 June17. El porcentaje de lectura a una cobertura mínima a 30x sobre los genes diana, exones y regiones intrónicas flanqueantes hasta ±10 pb fue de 94%, con una profundidad de lectura media de 238x. Como genoma de referencia se utilizó la versión hg19 del genoma humano. La descripción de las variantes siguió las normas de la HGVS (del inglés, Human Genome Variation Society). Las variantes de interés fueron visualizadas mediante el programa gratuito de visualización de variantes IGV (del inglés, Integrative Genome Viewer) desarrollado por el Broad Institute.

C1. 3.5 EXOMAS DIRIGIDOS

C1. 3.5.1 SureSelectXT Focused Exome

Por otro lado, las muestras de ADN genómico de los 3 primeros pacientes de MUB inmersos en el estudio (MUB1-3), fueron secuenciadas mediante la metodología SureSelectXT Focused Exome (Agilent Technologies). Un método de secuenciación que, aunque recibe el nombre de Focused Exome, se dirige exclusivamente a genes que han sido asociados a alguna enfermedad. Es decir, no se trata de un exoma completo propiamente dicho, ya que no se secuencia todo el conjunto de exones y regiones intrónicas colindantes de un individuo. Sino más bien de un panel de genes de grandes dimensiones, prediseñado, en el cual se secuencian una media de 5 000 genes que han sido asociados a alguna patología en las principales bases de datos clínicas como: Clinvar[258], la Human Gene Mutation Database (HGMD)[260] y la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)[261] y con un porcentaje de lectura cercano al 98% a una cobertura mínima de 20x.

De nuevo, se utilizó un método de captura de las regiones de interés basado en la hibridación con sondas específicas (SureSelectXT). El protocolo de secuenciación, fue llevado a cabo por el personal de la unidad de secuenciación masiva de la FPGMX, en la plataforma de secuenciación IonTorrent Personal Genome Machine (PGM) System (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA), de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial.

Los datos obtenidos tras el proceso de secuenciación, fueron analizados por los bioinformáticos de la FPGMX mediante las herramientas bioinformáticas TVC 5.0-13, GATK v3.5-0, TMAP 5.0.13, Picard 2.1.1, BEDtool v2.25.0, SAMtools 1.3.1 y ExomeDepth 1.1.18. El porcentaje de lectura a una cobertura mínima a 30x sobre los genes diana, exones y regiones intrónicas flanqueantes hasta ±10 pb, así como la profundidad de lectura media para cada paciente se resumen en la tabla 13. Como genoma de referencia se utilizó la versión hg19 del genoma humano. La descripción de las variantes siguió las normas de la HGVS. Las variantes de interés fueron visualizadas mediante el programa gratuito de visualización de variantes IGV (Broad Institute).

PACIENTE	% COB≥30X	PROF.LECTURA MEDIA
MUB1	96	203x
MUB2	91	101x
MUB3	96	228x

Tabla 13*:* Datos de cobertura mínima a 30x y profundidad de lectura media del Exoma Focused de los pacientes MUB1, MUB2 y MUB3. COB≥30x:** Porcentaje de cobertura media mayor o igual que 30x. **Prof.Lectura Media:** Profundidad de lectura media

C1. 3.5.2 IDT_xGEN Exome Research panel

Debido a la actualización de las plataformas de secuenciación de la FPGMX que consistió en la sustitución de los sistemas de secuenciación con tecnología Ion Torrent, por las plataformas de secuenciación de Illumina en el año 2018, la muestra de ADN genómico del último paciente con MUB incorporado al estudio (MUB4), fue sometida a una tecnología de secuenciación distinta. Concretamente, se utilizó la metodología IDT (del inglés. Integrated DNA Technologies) xGen Exome Research Panel (Illumina, NextSeq 500).

El proceso de secuenciación fue llevado a cabo por los profesionales de la plataforma de secuenciación masiva de la FPGMX, siguiendo el protocolo determinado por la casa comercial.

Este diseño permite secuenciar de forma dirigida aproximadamente 19 396 genes del genoma humano. Se trata también de un exoma dirigido y no de un exoma completo, pues se incluye sólo la secuencia codificante (exones) de los genes humanos que se encuentran incluidos en la base de datos Reference Sequence (RefSeq).

Los datos obtenidos del proceso de secuenciación fueron analizados por los bioinformáticos de la FPGMX mediante las herramientas bioinformáticas: Fastp v0.19.5, bwa 0.7.17-r1188, GATK v3.8-0, GATK v4.0.11.0, Picard 2.18.23, BEDTools V2.27.1, SAMTools 1.9, ExomeDepth 1.1.10, ANNOVAR 2018Apr16. Se tomó la versión hg19 del genoma humano como genoma de referencia. El porcentaje de lectura a una cobertura mínima de 30x sobre los genes diana, exones y regiones intrónicas flanqueantes hasta ±10 pb fue de 99%. Y la profundidad de lectura media fue de 151x. Las variantes de interés fueron visualizadas mediante IGV (Broad Institute). La descripción de las variantes siguió las normas de la HGVS.

C1. 3.6 ESTUDIO DEL GEN *TERF2IP*

Ante el hallazgo de una variante patogénica en el gen *TERF2IP* en el exoma del paciente MUB4, y teniendo en cuenta que se trata de un gen de interés de predisposición a melanoma, se comprobó la cobertura para este gen en el SureSelect Focused Exome (Agilent), metodología utilizada en la secuenciación de los casos MUB1-3, y se vio que este gen no se encontraba cubierto en el diseño del exoma dirigido de Agilent. Debido a este hallazgo y ante el interés que suscitaba este gen respecto a la patología en estudio, se decidió proceder a su secuenciación de manera aislada en los otros tres casos de MUB (MUB1-3).

Los datos resultantes del proceso de secuenciación fueron analizados por los bioinformáticos de la FPGMX con las herramientas bioinformáticas fastp v0.20.0, bwa 0.7.17-r1188, GATK v3.8-0, GATK v4.1.3.0, Picard 2.20.8, BEDTools v2.29.0, SAMtools 1.9, ExomeDepth 1.1.10, HaploGrep v2.1.19, ANNOVAR 2018Apr16. Se utilizó la versión hg19 del genoma humano como genoma de referencia. El porcentaje de lectura a una cobertura mínima a 30x sobre los genes diana, exones y regiones intrónicas flanqueantes hasta ±10 pb fue del 100%. Y la profundidad de lectura media fue de 713x.

Las variantes de interés fueron visualizadas mediante el programa gratuito de visualización de variantes IGV (Broad Institute). La descripción de las variantes siguió las normas de la HGVS.

C1. 3.7 SELECCIÓN E INTERPRETACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS

C1. 3.7.1 Estrategia de filtrado o cribado

En el primer paso de la estrategia de filtrado o priorización de variantes llevada a cabo, se seleccionaron sólo aquellas variantes raras. Es decir, todas aquellas que mostrasen una frecuencia alélica poblacional igual o inferior al 0.5% (MAF≤0.005, del inglés, Minor Allele Frequency) en población Europea no-finlandesa, en las principales bases de datos poblacionales; GnomAD Browser (Broad Institute, https://gnomad.broadinstitute.org). Asimismo, se tuvieron en cuenta las frecuencias en población europea derivadas del repositorio del proyecto de los 1000 genomas y el repositorio dbSNP.

Para los estudios comparativos, se tomó como población control el grupo de población europea no-finlandesa de la cohorte no-cáncer (GnomAD_non-cancer-NFE), compuesta por las secuencias de 134 187 muestras, de las cuales 59 095 corresponden a secuencias de exomas y las restantes a genomas completos.

Centrándose en el estudio del tipo de variantes, se excluyeron en primer lugar todas aquellas variantes sinónimas y que careciesen de un posible efecto sobre el *splicing*. Y dentro de las variantes exónicas que cumplían los parámetros exigidos de frecuencia y cobertura, se seleccionaron:

- Variantes con posible efecto truncante sobre la proteína (LoF): *nonsense y frameshift.*
- Variantes situadas en sitios canónicos de *splicing* (±2 pb)
- Variantes *missense* con alto impacto funcional.

C1. 3.7.2 Priorización e interpretación de las variantes

Una vez seleccionadas las variantes de interés, en un segundo paso tras la estrategia de filtrado llevada a cabo y con el objetivo de alcanzar una selección más exhaustiva de las variantes, se estudiaron todas aquellas reportadas como patogénicas o probablemente patogénicas en la literatura o en las principales bases de datos clínicas como HGMD® Proffessional[262] o ClinVar [258], así como todas las variantes truncantes o inactivantes detectadas.

Se seleccionaron variantes no-sinónimas con un CADD≥20[263] y que tuviesen, además, predicciones *in silico* que indicasen un posible

efecto patogénico sobre la proteína (dann>0.,995; SIFT<0,005; Polyphen>0,85; REVEL>0,45; LRT>0,9; GERP>3,0;). Así como las variantes que pudiesen afectar al *splicing*, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el uso de Alamut® Visual (v.2.9.0, Interactive Biosoftware, Rouen, France), en la cual se incluyen herramientas de predicción *in silico* de alteraciones en los sitios de *splicing* como SpliceSiteFinder-like, MasXEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer y Human Splicing Finder. O en base a la estimación del predictor dbscSNV_ADAscore, considerando efecto patogénico cuando el valor obtenido para este predictor era >0.6.

Del mismo modo, se tuvo en cuenta a la hora de interpretar las variantes, información acerca del gen en el cual se encontraban, su función, su patrón de expresión, el modelo de herencia asociado a este gen o las rutas de señalización en las cuales estaba implicado, utilizando repositorios públicos como KEGG (del ingés, Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html). Centrándonos inicialmente en genes relacionados con el MU, genes relacionados con otros tipos de cáncer (incluidos los implicados en otros tipos de melanomas como el cutáneo), genes implicados en el proceso de melanogénesis y genes implicados en procesos de reparación del ADN.

Todas las variantes detectadas y seleccionadas como de interés fueron evaluadas utilizando VARSOME[264] (http://varsome.com.), una herramienta bioinformática disponible online, que actúa como repositorio de variantes genéticas y motor de búsqueda disponible para la comunidad científica, permitiendo llevar a cabo un análisis del impacto de la variación genética humana que facilita la clasificación de las variantes genéticas identificadas en una de las cinco categorías determinadas por las guías de la ACMG[250]; variantes patogénicas, probablemente patogénicas, benignas, probablemente benignas o de significado incierto.

La estrategia de filtrado e interpretación de las variantes, se resume en la figura 15 mostrada a continuación. La priorización de los genes candidatos se basó fundamentalmente en un amplio estudio bibliográfico utilizando recursos online como el repositorio GeneCards (https://www.genecards.org) con sus diferentes herramientas gratuitas,

la base de datos Human Phenotype Ontology (HPO; http://human-phenotype-ontology.github.io)[265], UniProt[266] y el repositorio de variantes somáticas en cáncer COSMIC (del inglés, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)[267].

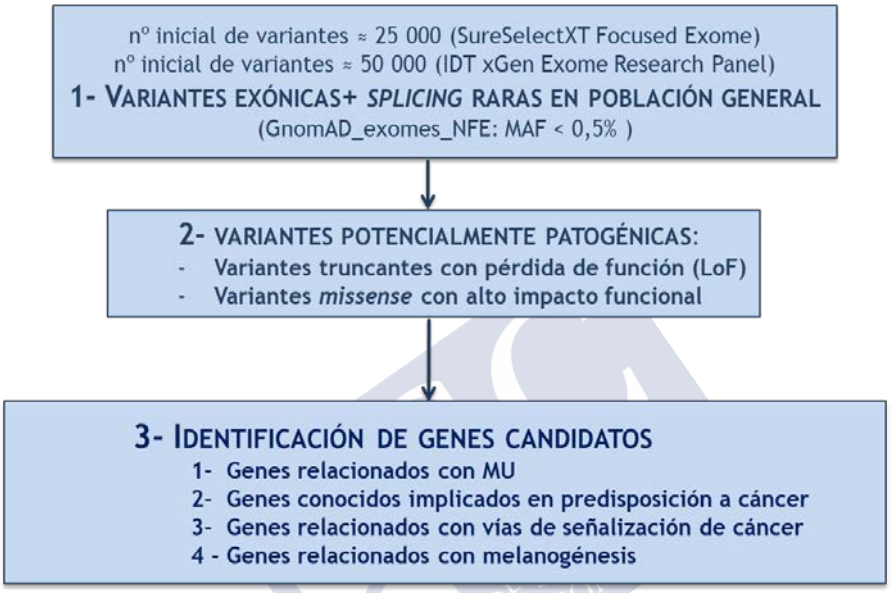


Figura 15: Esquema representativo de los principales pasos de filtrado y priorización de variantes llevadas a cabo en el estudio.

C1. 3.7.3 Estudio de las variantes de significado incierto

Para el estudio de las variantes de significado incierto (del inglés, Variants of Uncertain Significance; VUS) se recolectó una gran cantidad de información acerca de los genes en los cuales se encontraba la variante detectada para determinar si se trataba de una variante ya descrita, o si existían estudios funcionales para la misma o para variantes similares en el gen en cuestión.

La determinación de las variantes VUS como potencialmente patogénicas se basó en una estrategia combinada basada en el estudio de las predicciones bioinformáticas *in silico*, con información fenotípica del paciente portador y con la bibliografía.

Cuando la cantidad de información recaudada no aportaba datos acerca de estudios funcionales, el riesgo no estaba claramente

establecido de acuerdo a la bibliografía, bases de datos consultadas o la determinación de predicciones *in silico* contradictorias, las variantes fueron consideradas como de significado incierto. Y aquellas situadas en genes de interés que mostraban al menos cuatro predicciones *in silico* que sugerían un efecto patogénico, se priorizaron como de significado incierto potencialmente patogénicas.

C1. 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico aplicado se realizó con el software R v4.0.3 (https://www.r-studio.com/es/). Se compararon las frecuencias de variantes patogénicas en los genes de interés entre los pacientes con MUB y la población control (GnomAD_non-cancer_NFE y GnomAD control_NFE). Se obtuvieron las Odds Ratio (OR) y el p-valor medio de la prueba exacta de Fisher de dos colas para la hipótesis nula de que la OR es igual a 1, utilizando el paquete exact2x2 de la Fundación R (https://www.r-project.org/foundation).

Los intervalos de confianza se realizaron con un nivel de confianza del 95%. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C1. 4. RESULTADOS

En este capítulo de la presente tesis doctoral, se trató de identificar la posible causa genética subyacente al desarrollo de un MUB en 4 pacientes no relacionados y diagnosticados de MUB de manera consecutiva en la URQTIA. Los procesos de análisis, priorización de variantes, estudio estadístico y correlación genotipo-fenotipo, fueron llevados a cabo por la doctoranda.

C1. 4.1 PANEL DE GENES DE PREDISPOSICIÓN A MELANOMA

En el primero de los pacientes diagnosticados, se secuenciaron, inicialmente, los principales genes de predisposición a MMC y MU mediante el diseño de un panel de genes específico en el que se incluían las regiones exónicas completas y regiones intrónicas flanqueantes (±10 pb) de los genes *BAP1, CDKN2A, CDK4, MC1R, MITF, TERT* y *XRCC3*. Después de analizar la secuencia de estos genes, comprobamos que el paciente MUB1 no presentaba ninguna variante patogénica, probablemente patogénica o de significado incierto en ninguno de ellos.

La única variante exónica identificada en este paciente en el panel estudiado, consistió en un polimorfismo presente en el gen *XRCC3* (OMIM 600675). Concretamente, se detectó un cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición cromosómica chr14:104165753, con una frecuencia poblacional total del 38%.

C1. 4.2 RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN DE EXOMAS DIRIGIDOS

Después de no haber detectado ninguna variante con posible relevancia clínica en el paciente MUB1 en el panel de genes de predisposición a melanoma diseñado, se procedió al análisis mediante secuenciación de exomas dirigidos, de ADN germinal de los 4 pacientes afectados de MUB. Para los 3 primeros pacientes diagnosticados de esta patología en la URQTIA (MUB1-3) se empleó la misma metodología (SureSelectXT Focused Exome). Mientras que para el cuarto (MUB4),

se empleó una metodología de secuenciación distinta y se procedió a la secuenciación de un exoma dirigido de mayor capacidad (IDT xGen Exome Research Panel). En los siguientes subapartados se detallan los resultados obtenidos mediante esta aproximación.

C1. 4.2.1 Total de variantes identificadas y datos de cobertura

El promedio de variantes totales observado tras el proceso de secuenciación se situó en 29 965 en el caso de los exomas SureSelectXT Focused Exome, mientras que en el caso del exoma dirigido IDT xGen Exome Research Panel la cantidad de variantes obtenidas inicialmente fue de 48 558, casi el doble de variantes en el paciente MUB4 que en los pacientes MUB1-MUB3 (Tabla 14).

Una vez llevado a cabo el filtrado de variantes en cuanto a frecuencia (GnomAD_exomes_NFE <0,5%), se observó una media de 161 variantes exónicas y de *splicing* en el caso de los SureSelectXT Focused Exome y 299 variantes en el IDT xGen Exome Research Panel, que en su mayoría fueron de tipo *missense*.

Tras la estrategia de filtrado y cribado de variantes seguida, la mayor parte fueron descartadas por encontrarse representadas en una frecuencia superior a 0,5% (GnomAD_exomes_NFE), por la funcionalidad asociada a los genes en los que se encontraban o porque los predictores *in silico* de patogenicidad excluían su posible efecto deletéreo.

DATOS/TECNOLOGÍA	Exoma Focused	Exoma IDT
Promedio de variantes totales	26 965	48 558
Promedio de variantes MAF≤0.1% (exónicas + splicing)	161	299
Promedio de deleciones *frameshift*	1	6
Promedio de inserciones *frameshift*	0	5
Promedio de variantes *nonsense*	1	6
Promedio de variantes *missense*	72	168
Variantes *splicing* ±5pb	6	17
% Cobertura media a 30x	94%	99%
Profundidad de lectura media 30x	177x	151x

Tabla 14: Resumen detallado del promedio de variantes obtenidas tras cada proceso de secuenciación. Se muestra el promedio del número de cada tipo de variantes después del filtrado por frecuencia (MAF<0,5%).

C1. 4.2.1.1 Estudio del gen *BAP1*

Tras llevar a cabo un filtrado específico para el gen *BAP1* en los 4 pacientes estudiados, se vio que ninguno de ellos presentaba variantes raras en este gen que fuesen patogénicas, probablemente patogénicas o de significado incierto.

Sólo los pacientes MUB2 y MUB4 presentaron una variante de frecuencia poblacional reducida en *BAP1*. En ambos casos, se trató de una variante sinónima sin efectos deletéreos predichos sobre el proceso de *splicing* (Tabla 15).

Concretamente, en el paciente MUB2 se detectó la variante NM_004656.4(BAP1):exon15:c.1962A>C:p.V654V con frecuencia poblacional de 0,000185 (GnomAD_non-cancer_exomes_NFE). Esta variante supone un cambio de un nucleótido de adenina (A) por uno de guanina (G) en la posición 1962 del gen sin cambio en la secuencia proteica (p.Val654=). El análisis de esta variante permitió su clasificación como probablemente benigna en base a los criterios de la guía publicada por la ACMG (Tabla 15).

En el caso del paciente MUB4, se identificó la variante

NM_004656.4(BAP1):exon13:c.1413T>G;p.A417A, que supone el cambio de un nucleótido de timina (T) por uno de guanina (G) en la posición 1413 del gen, sin dar lugar a ningún cambio en la secuencia proteica (p.Ala417=). Esta variante también fue clasificada como benigna de acuerdo a los criterios de la ACMG.

Paciente Id	Variante	CLASIFICACIÓN ACMG	Criterios
MUB2	c.1962A>C; p. V654V	**Benigna**	**BP6** Clasificada como benigna en ClinVar con 2 estrellas, sin conflictos.
			BS1 Frecuencia alélica de 0,000294 en GnomAD. Superior al umbral de 0,0001 derivado de las 1148 variantes con relevancia clínica descritas para este gen.
			BS2 Detectada 74 veces en individuos adultos sanos, superior al umbral de 5 establecido para un gen dominante como *BAP1*.
			BP4 Dann predice que es benigna frente a ninguna predicción de patogenicidad.
			BP7 Variante sinónima sin efectos predichos sobre el *splicing*.
MUB4	c.1413T>G; p. A471A	**Benigna**	**BA1:** Frecuencia alélica de 0,068 en población africada (GnomAD_exomes), superior al umbral de 0,05.
			BS1: Clasificada en ClinVar como benigna con 2 estrellas y 6 suscripciones, sin conflictos.
			BP4: Dann la clasifica como benigna frente a ninguna predicción de patogenicidad.
			BP7: Variante sinónima sin efectos predichos sobre el *splicing* en una posición no fuertemente conservada.

Tabla 15: Descripción de las variantes sinónimas detectadas en el gen *BAP1* (NM_004656.4) en los pacientes MUB2 y MUB4 y su correspondiente clasificación de acuerdo a las guías de la ACMG, mediante la herramienta VarSome.

C1. 4.2.2 Resultados de la secuenciación de exomas dirigidos

C1. 4.2.2.1 Variantes de interés clínico en el paciente MUB1

En el paciente MUB1, se seleccionaron 7 variantes con posible interés clínico para su estudio en profundidad (Tabla 16).

De ellas, 2 variantes de tipo *missense*, detectadas en heterocigosis en los genes *RBBP8* y *MTHFD1*, fueron clasificadas como probablemente patogénicas, de acuerdo a los criterios de la ACMG.

Asimismo, en el gen *PARK2*, se detectó una variante de tipo *missense*, en heterocigosis, ya descrita en las principales bases de datos y clasificada como patogénica en relación a enfermedad de Parkinson juvenil tipo 2 autosómico recesivo (OMIM 600116).

Finalmente, las 6 variantes restantes fueron clasificadas como VUS

debido a que presentaban criterios de patogenicidad y benignidad contradictorios. De ellas, la variante detectada en el gen *WNT10B* (p.I285T), también fue identificada en el paciente MUB4. Mientras que la variante detectada en el gen *PREX2*, se priorizó como VUS-probablemente patogénica en relación al fenotipo en estudio, por encontrarse relacionad, a nivel somático, con el proceso de tumorogénesis asociado a otros tipos de melanoma.

C1. 4.2.2.2 Variantes de interés clínico en el paciente MUB2

En el paciente MUB2, se seleccionaron 4 variantes con posible relevancia clínica para su estudio en profundidad (Tabla 17).

Todas fueron clasificadas como VUS por mostrar criterios contradictorios de patogenicidad. La variante detectada en el gen *LZTS1* se clasificó como de significado incierto-probablemente patogénica, por encontrarse en un gen ampliamente relacionado con el MU. Mientras que la detectada en el gen *TYRP1*, fue considerada como VUS en relación al MUB, pero probablemente benigna.

C1. 4.2.2.3 Variantes de interés clínico en el paciente MUB3

En el paciente MUB3, 6 variantes fueron consideradas como potencialmente relevantes a nivel clínico (Tabla 18).

De las 6 variantes, la detectada en el gen *JAK2* fue clasificada como patogénica de acuerdo a las guías de la ACMG. Mientras que las detectadas en los genes *BAX*, *ATR y TP63* se clasificaron como probablemente patogénicas.

El resto de las variantes seleccionadas en este paciente para un estudio en mayor profundidad, fueron clasificadas como VUS, encontrándose una de ellas en el gen *APC*, uno de los genes típicamente asociados con predisposición a cáncer.

C1. 4.2.2.4 Variantes de interés clínico en el paciente MUB4

El paciente MUB4, mostró 6 variantes con posible relevancia clínica, de las cuales sólo una variante *nonsense* localizada en el gen *TERF2IP* fue clasificada como probablemente patogénica.

Las 5 variantes restantes se clasificaron como VUS, incluyendo la deleción *frameshift* detectada en el gen *POLN* que, aunque *a priori* podría parecer probablemente patogénica, por el momento no se conoce con certeza el efecto de las variantes con pérdida de función en este gen (Tabla 19).

C1. 4.2.3 Secuenciación de gen *TERF2IP* en los pacientes MUB1-MUB3

Se llevó a cabo una ampliación de estudio mediante secuenciación completa del gen *TERF2IP* en las muestras de los pacientes MUB1-MUB3, ya que éste no se encontraba cubierto en el SureSelectXT Focused Exome. Sin embargo, no se detectaron variantes patogénicas, probablemente patogénicas o de significado incierto en el gen *TERF2IP* para ninguno de los 3 pacientes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Variante	Clasificación	Criterio ACMG	Explicación de los criterios
*RBBP8:*c.248G>A (p.R83Q)	**Probablemente patogénica**	PVS1	Último nucleótido antes de un sitio de *splicing*, en un gen en el que la pérdida de función es un mecanismo conocido de patogenicidad.
		PM2	No detectada en GnomAD.
		PP3	10 predictores *in silico* indican que la variante es patogénica, incluyendo herramientas que predicen cambios en el *splicing.*
		BP1	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense,* muy reducido.
*MTHFD1:*c.854T>C (p.T906R)	**Probablemente patogénica**	PM2	Variante no descrita en GnomAD_exomes y GnomAD_genomes.
		PP3	Las predicciones *in silico* indican que la variante provoca un cambio en el *splicing,* que potencialmente podría ocasionar una pérdida de función para el gen, siendo este un mecanismo de patogenicidad conocido para el mismo. 7 predictores indican patogenicidad.
		PP2	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense*, muy elevado (>0,647).
PARK2:c.823G>A (p.R275W)	**Patogénica**	PP5	Variante patogénica en ClinVar, UniProt y VARSOME.
		PM1	Localizada en un dominio con 27 variantes descritas de las cuales 18 son patogénicas. Tasa de patogenicidad del 67%.
		PM2	Nunca detectada en homocigosis en GnomAD_exomes o GnomAD_genomes.
		PP3	Al menos 10 predictores *in silico* indican que la variante es patogénica.
		BP1	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense,* muy reducido (<0.647).
*ATR:*c.6221+3G>A (p.?)	**Sig. Incierto**	PM2	Nunca detectada en homocigosis en GnomAD_exomes o GnomAD_genomes.
		BP4	Un predictor *in silico* la clasifica como benigna, frente a ninguna clasificación como patogénica.
PREX2:c.1657G>A (p.E553K)	**Sig. Incierto** (Prob.patogénica)	PP2	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense,* muy elevado (>0,647).

		PP3	9 predictores *in silico* indican patogenicidad, frente a 3 que predicen efecto neutral.
SLC22A18:c.469G>A (p.G157R)	**Sig.Incierto**	PVS1	Último nucleótido antes de un sitio de *splicing* en un gen en el que la pérdida de función es un mecanismo conocido de patogenicidad
		PP3	8 predictores *in silico* indican patogenicidad, frente a 5 que predicen efecto neutral.
		BS1	Frecuencia de 0,000145 en población latina en GnomAD_exomes, >0,0001 (umbral calculado en base a las 12 variantes reportadas clínicamente para *SLC22A18*).
		BP1	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense*, muy reducido (<0,647).
WNT10B:c.854T>C (p.I285T)	**Sig.Incierto**	PM2	Nunca detectada en homocigosis en GnomAD_exomes o GnomAD_genomes.
		PP2	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense*, muy elevado (>0.647).
		PP3	10 predictores *in silico* indican patogenicidad, frente a 2 que predicen efecto neutral.
		BP6	UniProt la clasifica como benigna en relación a obesidad.

Tabla 16: Variantes con posible interés clínico seleccionadas para su estudio en profundidad en el paciente MUB1, tras el proceso de filtrado de variantes. Se detalla su clasificación en cuanto a patogenicidad de acuerdo a los criterios de la ACMG con ayuda de la herramienta online VarSome.

Variante	Clasificación	Criterio ACMG	Explicación de los criterios
*LZTS1:*c.1523G>A p.(R508Q)	**Sig.Incierto** (Prob.patogénica)	PM2	4 alelos en GnomAD_exomes, situado por debajo del umbral de 5 para el gen *LZTS1*. No detectada en GnomAD_genomes.
		PP3	6 predictores *in silico* indican patogenicidad.
		BP1	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense*, reducido (<0,647).
*RECQL4:*c.3493C>T p.(H1165Y)	**Sig.Incierto**	PM2	Variante no detectada en GnomAD.
		PP3	6 predictores *in silico* indican patogenicidad.
		BP1	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense*, reducido (<0,647).
SMAD4:c.677C>T p.(A226V)	**Sig.Incierto** (Prob. benigna)	PP2	GnomAD *missense* Z-Score= 4.13 (>0.647).
		BS1	Frecuencia alélica GnomAD_exomes_Latino=0,000405 (superior 0,0001; el umbral derivado de las 932 variantes clínicamente reportadas).
		BS2	Variante detectada 21 veces en población adulta sana en GnomAD_exomes, superior a lo esperado para un gen dominante como *SMAD4* (umbral de 5).
*TYRP1:*c.1523A>G p.(D508G)	**Sig.Incierto** (Prob.benigna)	PM2	Nunca detectada en homocigosis en GnomAD.
		BP1	GnomAD *missense* Z-Score= -2.15 (<0.647).
		BP4	7 predictores *in silico* indican que es benigna.

Tabla 17: Variantes con posible interés clínico seleccionadas para su estudio en profundidad en el paciente MUB2, tras el proceso de filtrado. Se detalla su clasificación en cuanto a patogenicidad de acuerdo a los criterios de la ACMG, con ayuda de la herramienta online VarSome.

Variante	Clasificación	Criterio ACMG	Explicación de los criterios
*JAK2:*c.1849G>T p.(V617F)	**Patogénica**	PS3	Variante patogénica en ClinVar.
		PM1	15 variantes en UniProt de las cuales 14 patogénicas (Patogenicidad=93.3%).
		PM5	La variante alternativa p.(Val607Ile), clasificada como patogénica en UniProt.
		PP2	GnomAD *missense* Z-Score= 0.896 (>0.647).
		PP3	10 predictores i*n silico* indican patogenicidad, frente a 2 que la clasifican como benigna.
		PP5	14 usuarios la clasifican como patogénica en VarSome. UniProt la clasifica como patogénica.
*BAX:*c.9delC p.(A4Pfs*51)	**Probablemente patogénica**	PVS1	Variante nula en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo conocido de patogenicidad.
		PM2	Variante no detectada en GnomAD.
*TP63:*c.448G>A p.(A150T)	**Significado Incierto** (Prob.patogénica)	PM2	Variante no detectada en GnomAD.
		PP2	GnomAD *missense* Z-Score= 2.21 (>0.647).
		PP3	9 predictores *in silico* la clasifican como patogénica, frente a 3 que la definen como benigna.
*ATR:*c.6226C>G p.(L2076V)	**Probablemente patogénica**	PM1	En UniProt hay descritas 6 variantes en el dominio FAT de la proteína ATR humana, de las cuales 3 son patogénicas y 3 benignas (patogenicidad = 50%).
		PM2	Variante no descrita en homocigosis en GnomAD.
		PP2	GnomAD *missense* Z-Score= 4.36 (>0,647).
		PP3	9 predictores *in silico* indican patogenicidad, frente a 3 que la clasifican como benigna.
APC:c.5816A>T p.(D1939V)	**Significado Incierto**	PM2	Variante detectada en 1 único alelo en GnomAD_exomes (por debajo de 5 que es el umbral para este gen dominante). No detectado en GnomAD_genomes.
		PP3	7 predictores *in silico* indican patogenicidad frente a 5 que

			indican que es un cambio benigno.
		BP1	GnomAD *missense* Z-Score= 0.168 (<0.647).
*EWSR1:*c.807G>T p.(Q269H)	**Significado Incierto**	PM2	Variante no detectada en GnomAD.
		PP2	GnomAD *missense* Z-Score= 2.52 (>0.647)
		PP3	7 predictores *in silico* indican patogenicidad frente a 5 que la clasifican como benigna.

Tabla 18: Variantes con posible interés clínico seleccionadas para su estudio en profundidad en el paciente MUB3, tras el proceso de filtrado de variantes. Se detalla su clasificación en cuanto a patogenicidad de acuerdo a los criterios de la ACMG, con ayuda de la herramienta online VarSome.

Variante	Clasificación	Criterio ACMG	Explicación de los criterios
*TERF2IP:*c.1090C>T p.(R364*)	**Probablemente Patogénica**	PVS1	Variante nula (*nonsense*), en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo conocido de patogenicidad.
		PP3	5 predicciones *in silico* la clasifican como patogénica, frente a ninguna clasificación como benigna.
*POLN:*c.2488_2489delCA p.(Q830Ffs*42)	**Significado Incierto**	PVS1	Variante nula, deleción *frameshift*.
		PM2	Variante no detectada en GnomAD.
		PP3	El predictor *in silico* GERP la clasifica como patogénica.
*RAD54L:*c.604C>T p.(R202C)	**Significado Incierto**	PM1	Variante situada en el dominio Helicase ATP-binding, donde se han descrito 3 variantes de las cuales 2 han sido clasificadas como patogénicas (Tasa de patogenicidad: 66,7%).
		PP3	8 predicciones *in silico* indican que es una variante patogénica frente a 4 que la clasifican como benigna.
		BS1	Frecuencia alélica en GnomAD_exomes de 0,00306, superior al umbral de 0,00105 calculado en base a 25 variantes patogénicas descritas en *RAD54L*.
		BP1	GnomAD *missense* Z-Score= -0,252 (<0,647).
		BP6	Variante benigna en UniProt.
*PDGFRA:*c.526G>T p.(R176C)	**Significado Incierto**	PM2	Descrita 1 vez en GnomAD_exomes. No descrita en GnomAD_genomes.
		PP2	GnomAD *missense* Z-Score= 1,94 (>0,647).
		PP3	10 predicciones *in silico* indican patogenicidad, frente a 2 que indican que es benigna.
*HELQ:*c.338G>A p.(S133N)	**Significado Incierto**	PP3	7 predicciones *in silico* indican patogenicidad, frente a 4 que la clasifican como benigna.
		BP1	GnomAD *missense* Z-Score= 0,597 (<0,647).
*WNT10B:*c.854T>C	**Significado**	PM2	Nunca detectada en homocigosis en GnomAD_exomes o

p.(I285T)	**Incierto**		GnomAD_genomes.
		PP2	El Z-score de GnomAD, para valoración de patogenicidad asociada a variantes *missense*, muy elevado (>0.647).
		PP3	10 predictores in silico indican patogenicidad, frente a 2 que predicen efecto neutral.
		BP6	UniProt la clasifica como benigna en relación a obesidad.

Tabla 19: Variantes con posible interés clínico seleccionadas para su estudio en profundidad en el paciente MUB4, tras el proceso de filtrado. Se detalla su clasificación en cuanto a patogenicidad de acuerdo a los criterios de la ACMG, con ayuda de la herramienta online VarSome.

C1. 4.2.4 Posible correlación genotipo-fenotipo

Del total de 23 variantes seleccionadas entre los 4 pacientes, un 69,57% fueron clasificadas como de significado incierto (VUS). De ellas, 3 fueron priorizadas como posiblemente patogénicas en relación al MUB (*LZTS1*, *PREX2* y *TP63*). Además, la variante identificada en el gen *LZTS1*, en el paciente MUB2, fue la única detectada en un gen con relación conocida con el MU que, junto a las predicciones *in silico* de patogenicidad y su escasa frecuencia en población control, determinaron su priorización como VUS-probablemente patogénica.

El resto de variantes fueron detectadas en genes conocidos de predisposición a cáncer (*APC, PDGFRA, SMAD4, RECQL4*), genes relacionados con rutas de reparación del ADN (*ATR, RAD54L, HELQ, POLN*) o en otros genes relacionados o implicados en rutas de señalización de interés en melanoma u otros tipos de cáncer (*EWSR1, SLC22A18, TYRP1, WNT10B*).

Ninguno de los genes conocidos de predisposición a cáncer presentó mutaciones en más de un paciente, ni tampoco se asociaron a la presencia de otro tipo de cáncer en los mismos o en su familia. Tan sólo la paciente MUB4, que presentó una variante en el gen *PDGFRA*, desarrolló otro tipo de cáncer primario a lo largo del estudio, tratándose de un cáncer de mama. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la asociación de mutaciones puntuales en dicho gen y la predisposición frente a cáncer de mama o frente a algún tipo de melanoma, a pesar de que se encuentra implicado en la ruta se señalización KEGG hsa05218-Melanoma.

Del mismo modo, ninguno de los genes de predisposición a cáncer en los cuales se detectaron variantes se relacionó previamente con MU o con predisposición frente a otro tipo de melanoma. Por ello, las variantes no se priorizaron como potencialmente patogénicas y se mantuvieron como VUS, no descartándose ni confirmándose su posible implicación en el fenotipo en cuestión o en relación a otros tipos de cáncer no desarrollados por los pacientes durante el tiempo de este estudio.

En el paciente MUB3, se detectó una variante patogénica ya conocida en el gen *JAK2* por su implicación, tanto a nivel somático como germinal, en el desarrollo de síndromes mieloproliferativos

crónicos (OMIM 147796). De hecho, esta variante fue clasificada como patogénica en ClinVar y HGMD. Sin embargo, no tuvimos conocimiento de que la paciente MUB3 presentase un fenotipo sugestivo de neoplasia hematológica durante el transcurso de este estudio, por lo que dicha variante podría tratarse de un hallazgo incidental o secundario.

En el caso de las variantes en genes relacionados con reparación de ADN, en el gen *RBBP8*, se detectó una variante con posible pérdida de función en el paciente MUB1 que fue clasificada como probablemente patogénica en relación al fenotipo en estudio. En el gen *ATR* se detectaron 2 variantes en 2 pacientes distintos, una de ellas clasificada como probablemente patogénica (MUB3) y la otra como de significado incierto (MUB1). Tanto el gen *RBBP8* como el gen *ATR* muestran relación con otros genes y rutas de señalización con relevancia clínica ya descrita en el MU como el gen *BAP1*, la ruta de señalización asociada a Rb o la ruta de reparación asociada a *BRCA1*. Además, el gen *ATR* se localiza en el cromosoma 3, que típicamente sufre aneuploidía (monosomía 3) a nivel somático en el MU.

Las variantes detectadas en *RAD54L*, *POLN* y *HELQ*, se detectaron en la paciente MUB4, la única que además de un MUB mostró otro cáncer primario. Por lo que, aunque de significado incierto, no se descartó que dichas variantes pudiesen contribuir a generar una inestabilidad genómica potencial que pudiese explicar la coocurrencia de 3 tumores primarios en la paciente. La variante detectada en *POLN*, a pesar de ser una deleción *frameshift* con posible efecto de pérdida de función sobre la proteína sintetizada, se mantuvo como VUS dado que se desconoce el efecto fenotípico de la pérdida de función de la proteína codificada por este gen.

Otras 4 variantes se localizaron en genes relacionados de algún modo (predisposición, rutas de señalización asociadas a melanoma o mutados a nivel somático) con melanoma maligno cutáneo o con la ruta de señalización asociada a melanoma (KEGG hsa05218-Melanoma) (*TERF2IP*, *TYRP1*, *BAX*, *WNT10B*, *PREX2*). Específicamente en el gen *TERF2IP*, considerado de riesgo moderado frente a la predisposición genética familiar a MMC, se detectó en el paciente MUB4, una variante *nonsense* ya descrita como patogénica en la base de datos HGMD en

relación a MMC y otros tipos de cáncer en una misma familia. Con todo, dicha variante fue considerada como probablemente patogénica en relación al MUB y al cáncer de mama desarrollados por esta paciente en base a los criterios de la ACMG.

La variante del gen *PREX2* fue detectada en el paciente MUB2 y, a pesar de que fue clasificada como VUS en base a las guías de la ACMG, se priorizó como probablemente patogénica, ya que se encuentra en un gen que aparece recurrentemente mutado en ciertos tipos de melanoma, especialmente en el MMC y en el melanoma mucoso.

En el gen *TYRP1*, se detectó en el paciente MUB2, una variante *missense* de significado incierto, aunque probablemente benigna de acuerdo a las predicciones *in silico* de patogenicidad. Por lo que, aún en ausencia de estudios funcionales parece poco probable su posible implicación en la predisposición frente al MUB.

Los genes *BAX* y *WNT10B*, fueron seleccionados por su potencial patogenicidad y por formar parte de la ruta de señalización asociada a melanoma (KEGG hsa05218-Melanoma). La variante *frameshift* detectada en *BAX* en el paciente MUB3, fue clasificada como patogénica de acuerdo a los criterios de la ACMG y, además, este gen se priorizó como posible candidato para explicar el MUB de esta paciente en base a su implicación en varias rutas de señalización que podrían tener relevancia en el desarrollo de un MUB (KEGG: hsa05218-Melanoma, hsa04115-p53 Signaling pathway y hsa04210-Apoptosis). En el caso del gen *WNT10B*, implicado en melanogénesis (KEGG: hsa04916-Melanogenesis), se detectó la misma variante rara en 2 pacientes distintos (MUB1 y MUB4), por lo que se consideró de interés y aunque, no pudieron llevarse a cabo estudios funcionales para determinar el posible efecto de la misma, no pudo descartarse su posible contribución como gen de bajo riesgo al fenotipo de ambos pacientes, manteniéndose como VUS.

En los pacientes MUB1 y MUB3 se detectaron otras variantes en genes con posible relación con cáncer; (*MTHFD1, PARK2, SLC22A18*) *y* (*TP63, EWSR1*), respectivamente.

En el caso del paciente MUB1, las variantes detectadas en los genes *MTHFD1* y *PARK2*, clasificadas ambas como patogénicas de acuerdo

a los criterios de la ACMG fueron descartadas, *a priori*, como variantes candidatas a explicar el MUB desarrollado por el paciente. Por un lado, la detectada en *PARK2*, se trató de una variante conocida descrita en ClinVar como patogénica en relación a Parkinson de inicio juvenil tipo 2 autosómico recesivo (OMIM 600116), pero también en relación a predisposición genética frente al adenocarcinoma familiar de pulmón. Sin embargo, dada su frecuencia en población control (0,003), resultó poco probable su implicación en la predisposición frente a un tumor de extremada rareza como el MUB. Respecto a la variante patogénica detectada en el gen *MTHFD1*, no evidenció relación alguna con respecto al MUB, a pesar de que polimorfismos en este gen se han asociado con predisposición frente a otros tipos de cáncer como el colorrectal. Por otro lado, la variante detectada en el gen *SLC22A18*, se mantuvo como de significado incierto ante la escasa información disponible para el mismo en la bibliografía, relacionado en la base de datos OMIM con cáncer de mama y pulmón de origen somático (OMIM 114448).

Por último, la variante VUS-probablemente patogénica detectada en el gen *TP63*, no se descartó *a priori* para explicar el fenotipo de la paciente MUB3, tratándose de un gen implicado en la ruta de señalización de p53 (hsa04115-p53 Signaling pathway). Mientras que la implicación de la variante detectada en *EWSR1* parece muy poco probable, ya que a pesar de que este gen se relaciona con un tipo de cáncer específico y raro como el sarcoma de Ewing (OMIM 612219), las mutaciones puntuales con relevancia clínica en *EWSR1* han sido raramente descritas y no se detectó ninguna evidencia de su posible implicación en relación al MU o a otros tipos de melanoma.

C1. 4.3 INCIDENCIA DE VARIANTES PATOGÉNICAS EN LOS GENES CANDIDATOS EN POBLACIÓN CONTROL

Una vez establecida la posible correlación fenotipo-genotipo para las distintas variantes, se seleccionaron aquellos genes en los cuales se detectaron variantes posiblemente patogénicas en relación al MUB y que mostraron una mayor evidencia científica de ser candidatas a explicar la predisposición al desarrollo de un MUB o a su posible contribución. Se procedió a la comparación de la frecuencia de variantes patogénicas/probablemente patogénicas en los mismos entre pacientes y población control no-cáncer.

C1. 4.3.1 Estimación de la incidencia de variantes nulas en los genes *POLN, BAX, TERF2IP* y *RBBP8*

En el grupo de pacientes con MUB estudiado, se priorizó la selección de 4 variantes potencialmente truncantes situadas en los genes *POLN*, *BAX*, *TERF2IP y RBBP8*. Para cada uno de estos genes se estudió la presencia de variantes con pérdida de función en la población control (GnomAD_non-cancer_NFE) (Tabla 20).

Como resultado, vimos que para los 4 genes se vio un incremento significativo en la frecuencia de variantes de tipo truncante en los pacientes frente a las detectadas en la cohorte control (Odds Ratio: 93,04; 915,63; 1945,64; 522,33 respectivamente).

Con el objetivo de reducir un poco la incertidumbre asociada a la diferencia en el tamaño muestral de ambas poblaciones, se estableció la misma comparación en la subcohorte GnomAD_control_NFE (24 146 individuos), donde también se observó un incremento significativo en la incidencia de dichas variantes en los pacientes frente a la población control (Odds Ratio: 95,46; 958,08; 1736,67; 856,95, respectivamente) (Tabla 21). También se vio que existía una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias alélicas (del inglés, Variant Allele Frequency; VAF) para las variantes identificadas en los pacientes frente a las 2 poblaciones control, de acuerdo a los resultados obtenidos en el test exacto de Fisher (Tablas 20 y 21).

La deleción *frameshift* detectada en el gen *POLN* se incluyó en este análisis, para tratar de esclarecer su posible efecto patogénico.

		Pacientes MUB (n=4)			Cohorte control gnomAD_non-cancer-NFE (n= 59 095)				
GEN	**¥ pLI (90% IC)**	**Nº var. LoF**	**ALELOS**	**VAF**	**Nº var. LoF**	**ALELOS**	**VAF**	**OR (IC 95%)**	**Fisher test (p-valor)**
POLN	1,14 (0,92 - 1,42)	1	8	0,1250	181	118190	0,00153	93,04 (2,06 - 740,03)	0,01225
TERF2IP	0,66 (0,39 - 1,14)	1	8	0,1250	18	118190	0,00015	915,633 (19,72 - 8192)	0,00128
BAX	0,24 (0,1 - 0,75)	1	8	0,1250	8	118190	0,00007	1945,64 (41,68 - 16384)	0,00061
RBBP8	0,54 (0,4 – 0,75)	1	8	0,0125	32	118158	0,00027	522,330 (11,35 – 4019,61)	0,00223*

Tabla 20: Frecuencia de las variantes truncantes detectadas en los genes *POLN*, *TERF2IP*, *BAX* y *RBBP8* en los pacientes con MUB incluidos en el estudio. Comparación con la cohorte GnomAD_non-cancer_NFE tomada como población control (n= 59 095). **pLI:** probability of Loss-of-function intolerance; **VAF:** variant allele frequency; **NFE**: non-Finish-European; **OR**: odds ratio; **IC:** intervalo de confianza. **¥** Es la ratio del número de variantes con pérdida de función (nulas, *splicing*) observadas para el gen en la base de datos GnomAD en relación a lo que cabría esperar si esas variantes fueran selectivamente neutrales. Los valores próximos a 0 indican baja tolerancia a la pérdida de función. Los datos fueron obtenidos del repositorio GnomAD versión 2.1.1 en enero de 2021.

	Pacientes MUB (n=4)			Cohorte control gnomAD_control_NFE (n=24146)				
GEN	**Nº var. LoF**	**ALELOS**	**VAF**	**Nº var. LoF**	**ALELOS**	**VAF gnomAD control_NFE**	**OR (IC 95%)**	**Fisher test (p-valor)**
POLN	1	8	0,1250	72	48292	0,00149	95,46 (2,09-61,31)	0,01203
TERF2IP	1	8	0,1250	7	48292	0,00014	958,08 (19,16-8192)	0,00132
BAX	1	8	0,1250	4	48292	0,00008	1736,67 (30,68-16384)	0,00083
RBBP8	1	8	0,1250	8	48292	0,00017	856,95 (17,03 -8192)	0,00149

Tabla 21: Frecuencia de las variantes truncantes detectadas en los genes *POLN*, *TERF2IP*, *BAX* y *RBBP8* en los pacientes con MUB incluidos en el estudio. Comparación con la cohorte GnomAD_control_NFE (n = 24 146). **LoF**: Loss-of-function; **VAF:** variant allele frequency; **NFE**: non-Finish-European; **OR**: odds ratio; **IC:** intervalo de confianza. Los datos fueron obtenidos del repositorio GnomAD versión 2.1.1 en enero de 2021.

C1. 4.3.2 Estimación de la incidencia de variantes patogénicas en población control en otros genes priorizados

La estimación de la incidencia de variantes patogénicas en los genes priorizados mostrados en la tabla 22, reveló una frecuencia significativamente incrementada en los pacientes con respecto a la población control no cáncer, siendo el gen *ATR* el que mostró una mayor significación dada la detección de 2 variantes distintas en 2 de los pacientes (MUB1 y MUB4) (Tabla 22).

GEN	Pacientes MUB (n=4) Nº variantes patogénicas	Cohorte control gnomAD_control_NFE (n=59 095) Nº variantes ¥ patogénicas	OR (IC 95%)	Fisher test (p-valor)
LZTS1	1 / 4	1 / 59 095	16382,89 (385,01 – 755851,93)	0,00014
TP63	1 / 4	8 / 59 095	2243,48 (84,91 – 24319,98)	0,00069
ATR	2 / 4	5 / 59 095	8191,03 (1009,48 – 118437,94)	0,00000007
PREX2	1/2	3/59 095	5460,97 (9,39e+01-4,50e+15)	0,00054

Tabla 22: Comparación de la frecuencia de variantes potencialmente patogénicas en los principales genes priorizados en los pacientes con MUB y en población control.¥ Número de portadores de variantes patogénicas estimado en la población control para cada gen, mediante el número de variantes alélicas de tipo *missense* descritas como patogénicas o probablemente patogénicas en ClinVar y las variantes nulas (*stopgain*, *frameshift deletions, frameshift insertions,* variantes canónicas de splicing) no descritas como benignas o de significado incierto en ClinVar. Datos consultados en agosto de 2020.

C1. 4.4 PROPUESTA DE POSIBLES GENES CANDIDATOS

Valorando en conjunto toda la información disponible en cuanto a patogenicidad, funcionalidad asociada a los distintos genes y estimación de la frecuencia de variantes patogénicas en los mismos en población control no-cáncer, se propusieron una serie de posibles genes candidatos a explicar la susceptibilidad genética de los pacientes MUB1-MUB4 a padecer un MUB primario. Dichos genes, así como el nivel de evidencia de su posible implicación en el desarrollo del MUB se detallan en la tabla 23.

GEN	Id Paciente	Evidencias	Nivel de evidencia
TERF2IP	MUB4	- Gen de riesgo moderado a predisposición a MMC. - Variante conocida; patogénica en relación a MMC y otros tipos de cáncer en una misma familia, incluido cáncer de mama. - Variantes detectada en el paciente MUB4: d neoplasias primarias distintas (MUB + carcinoma de mama). - Posible síndrome de predisposición a tumores asociado a mutaciones en este gen. - Miembro del complejo proteico *shelterina,* implicado en protección de los telómeros. - Gen *POT1,* miembro del mismo complejo proteico, asociado a predisposición genética frente a MU y síndrome de predisposición a tumores asociado a *POT1.* - Variantes patogénicas significativamente incrementadas frente a población control.	**Moderada**
BAX	MUB3	- Deleción *frameshift* en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo conocido de patogenicidad. - Variante no descrita previamente en población control. - Incidencia de variantes patogénicas significativamente incrementada en comparación con población control. - Gen expresado en melanocitos. - Implicado en rutas de señalización con posible significación clínica en el MU (melanoma, apoptosis, p53). - Gen implicado en melanogénesis. - Al menos un caso publicado, con una deleción germinal en *BAX,* que desarrolló un MMC primario y un cáncer gástrico primario.	Limitada
RBBP8	MUB1	- Mutación LoF en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo conocido de patogenicidad. - Codifica para una proteína implicada en reparación del ADN. - Forma un complejo proteico con *BRCA1*, modulando sus funciones de reparación, regulación transcripcional y ciclo celular. - Proteína con función de supresor tumoral. - Asociada a predisposición frente a otros tipos de cáncer (mama).	Limitada

		- Participa en la ruta de señalización asociada a Rb, comúnmente inhibida en MU. - Interacción directa con la proteína Rb. - Significativamente mutado en pacientes frente a población control.	
LZTS1	MUB2	- Gen ampliamente expresado en el tracto uveal. - Función de supresor tumoral. - Asociado a predisposición genética frente a cáncer de próstata y cáncer de esófago. - Supresor metastásico en MU. - Detección de variantes germinales en otros pacientes con susceptibilidad genética frente a MU[82]. - Significativamente mutado en pacientes frente a población control.	Limitada
ATR	MUB1 MUB3	- Gen localizado en el cromosoma 3. - Implicado en reparación del ADN. - Interacciona con los genes *BRCA1* y *BAP1*. - Significativamente mutado en pacientes frente a población control. - Predisposición a otros tipos de cáncer poco frecuentes. - Gen silenciado en un elevado porcentaje de MU, especialmente en los que muestran mayor riesgo metastásico.	Limitada
PREX2	MUB2	- Gen recurrentemente mutado a nivel somático en MMC y melanoma mucoso. - Interacciona con el gen *PTEN*, raramente mutado en MU, pero cuya función se encuentra comúnmente inactivada. - Significativamente mutado en pacientes frente a población control.	Evidencia insuficiente
TP63	MUB3	- Gen localizado en el cromosoma 3. - Implicado en la ruta se señalización asociada a p53. - Fenotipos asociados (HPO): alteraciones de la morfología uveal, predisposición a nevus melanocíticos, aplasia/hipoplasia de úvea, desarrollo de pecas o hiperpigmentación cutánea. - En MU, su pérdida de función conlleva a la inhibición de la vía p53.	Evidencia insuficiente

Tabla 23: Tabla resumen de los genes propuestos como posibles candidatos o sospecha de candidato de predisposición genética frente al desarrollo de un MUB primario. Los genes seleccionados como sospecha de candidatos se muestran en la tabla en orden decreciente de evidencia.

C1. 5. DISCUSIÓN

El estudio presentado en este capítulo, muestra los resultados derivados de una estrategia de secuenciación masiva basada en la secuenciación de exomas dirigidos en ADN germinal procedente de cuatro pacientes de origen caucásico, no relacionados y diagnosticados de MUB primario, dada la extremada rareza de esta neoplasia en la población general. El objetivo del estudio se centró en la búsqueda de nuevos genes de predisposición frente al MU, y se planteó bajo la necesidad de ahondar en las posibles causas genéticas que pueden motivar la aparición de un MUB primario. Así, este trabajo se ejecutó bajo la hipótesis de que el desarrollo de un MUB es sugestivo de la existencia de una predisposición genética a padecer este tipo de neoplasia, una idea que había sido formulada ya por Shammas et Wazke. en el año 1977[182]. Pues, teniendo en cuenta la reducida incidencia del MU en la población general, parece poco probable el desarrollo de este tumor de manera bilateral sin que exista una causa que lo justifique. Además, la aparición de tumores sólidos poco comunes, debe ser objeto de evaluación genética, incluso en ausencia de antecedentes familiares positivos. Aunque, es necesario tener en cuenta que, en ocasiones, la interpretación de la existencia de una predisposición genética puede ser complicada en algunos casos debido a la posible existencia de expresividad variable o a la escasa penetrancia de ciertas mutaciones en línea germinal.

Para tratar de cumplir el objetivo de esta investigación, se llevaron a cabo dos aproximaciones distintas, ambas basadas en la implementación de técnicas de secuenciación masiva en la búsqueda de genes de susceptibilidad frente al MUB primario. Por un lado, en tres pacientes (MUB1-MUB3) se llevó a cabo secuenciación de exoma dirigida empleando el panel prediseñado SureSelectXT Focused Exome (Agilent, ThermoFisher Scientific) y en el último paciente diagnosticado (MUB4) se utilizó, en cambio, la aproximación

prediseñada IDT xGen Exome Research Panel (Illumina) con la misma finalidad. Hasta donde llega nuestro conocimiento, los resultados obtenidos de la serie de pacientes aquí expuesta, suponen uno de los estudios más extensos a nivel genético aplicado a tratar de dilucidar la posible base genética subyacente al MUB primario, considerándolo como una entidad patológica única y de extremada rareza.

C1. 5.1 PREDISPOSICIÓN GENÉTICA FRENTE AL MELANOMA UVEAL BILATERAL

El MU se presenta, generalmente, como un tumor unilateral y unifocal, por lo que la aparición de formas bilaterales o multifocales supone un acontecimiento de extremada rareza. A nivel somático, en la oncogénesis y desarrollo del MU, se sabe que intervienen mutaciones en diferentes genes que se han ido describiendo con el paso de los años, así como ciertas características fenotípicas que suponen un mayor riesgo de desarrollar este tipo de tumores. Pero los estudios clínicos llevados a cabo históricamente en MU, han permitido la observación de casos de aparición juvenil, familiares, formas bilaterales o multifocales, muy raramente formas congénitas, así como la coocurrencia de otros tipos de cáncer primario en un mismo paciente, características todas ellas definitorias de la existencia de una clara predisposición genética frente al MU en algunos pacientes[192,268].

Las mutaciones más comúnmente descritas a nivel somático son las que implican a los genes *GNAQ* y *GNA11*, detectándose en aproximadamente un 86% de los MU[155]. Sin embargo, estas no han sido detectadas a nivel germinal[206] y, por tanto, la existencia de una susceptibilidad genética frente al MU no puede sustentarse en la variación asociada a estos genes. De hecho, el único gen que se ha descrito, hasta la fecha, como claramente asociado al desarrollo de un MU a nivel germinal es *BAP1*[78,229], que a día de hoy, continúa siendo el único que muestra una evidencia definitiva de asociación con la predisposición hereditaria frente al MU. La frecuencia de mutaciones patogénicas en *BAP1* se sitúa entre un 3-4% en pacientes con una amplia historia personal y familiar de cáncer[216,214], elevándose incluso hasta un 25% en los casos familiares de MU[216].

Con respecto a los casos de MUB publicados, el único estudio que por el momento establece una clara asociación entre el MUB y la presencia de mutaciones en un gen data del año 2019 y, en él, Yu MD. et al., también describen la presencia de mutaciones germinales en *BAP1* en dos pacientes con MUB primario no relacionados[208]. Sin embargo, la presencia de mutaciones en este gen parece no explicar todos los casos de MU con sospecha de predisposición genética y, aunque puntualmente se ha documentado la existencia de mutaciones germinales en otros genes como *BRCA2/BRCA1*[204,269,270], *MLH1*[82,271], *PALB2*[82], *CDKN2A*[194], *FLCN*[272,273], *MDB4*[83,274], *MSH6*[275] y *POT1*[84],es probable que otros genes de elevada o media penetrancia puedan estar implicados en la aparición del MU en pacientes sin alteraciones detectables en el gen *BAP1*.

Basándonos en la información disponible en el momento que se inició este estudio (2016), en este proyecto de la presente tesis doctoral, se trató de avanzar en el conocimiento de las bases genéticas implicadas en el desarrollo del MUB y, *por ende*, en el MU. Inicialmente, se procedió al diseño de un panel de genes donde, además del gen *BAP1*, se incluían los principales genes implicados en el desarrollo de otros tipos de melanoma como el cutáneo[276]. La secuenciación de este panel, se aplicó únicamente al paciente MUB1, ya que en ese momento era el único diagnosticado de esta patología en la unidad. Los resultados de este panel no revelaron la presencia de ninguna mutación patogénica, probablemente patogénica o de significado incierto en los genes estudiados. Únicamente se detectó el polimorfismo rs861539 en el gen *XRCC3*. La presencia de este polimorfismo se estudió en las distintas bases de datos clínicas (ClinVar y HGMD) y en la bibliografía, y se descartó su asociación con un riesgo incrementado de padecer un MMC[277] u otros tipos de cáncer[278]. Así, parecía poco probable que el desarrollo de un MUB en el paciente MUB1, estuviese asociado con variantes genéticas en alguno de los genes incluidos en el panel y asociados a predisposición a melanoma. Este resultado, suscitó la necesidad de elevar la complejidad del estudio a la búsqueda de nuevos genes de predisposición frente al MUB mediante la secuenciación de exomas dirigidos, a lo cual se sumó el diagnóstico de tres nuevos casos (MUB2-MUB4) que se incluyeron en el estudio.

Mediante la nueva aproximación seguida, se descartó en los 4 pacientes la presencia de mutaciones germinales en el gen *BAP1,* y sólo en 2 de ellos (MUB2 y MUB4) se detectaron 2 variantes raras distintas en este gen, aunque en ambos se trataba de variantes sinónimas con aparente efecto neutral sobre la proteína sintetizada, y fueron clasificadas como benignas en relación al desarrollo del MUB en estos pacientes. La ausencia de mutaciones patogénicas, probablemente patogénicas o de significado incierto en *BAP1* en los 4 pacientes, nos sugirió la idea de la existencia de heterogeneidad de locus para la predisposición genética frente al MUB, una hipótesis ya formulada con anterioridad en relación al MU unilateral[82], y contraria a la publicación de Yu et al. donde se vinculó el MUB a la presencia de mutaciones germinales en *BAP1* en 2 casos no relacionados[208]. Sin embargo, es preciso mencionar que nuestro estudio no fue el único en el cual se descartó la presencia de mutaciones germinales en *BAP1* en pacientes afectados de MUB, ya que se han publicado otros trabajos en los cuales se incluían casos de MU multifocales y algún caso de MUB primario, en los cuales no se identificaron mutaciones en este gen ni en los principales genes relacionados con MMC[208,279]. Resultados que también apoyarían la posible existencia de una predisposición genética asociada a mutaciones en genes alternativos sin relación, todavía conocida, con el MU. Aunque, es preciso mencionar que, mediante el estudio aquí presentado, no pudimos descartar la presencia de variaciones en regiones reguladores o regiones intrónicas profundas del gen *BAP1* con posible efecto deletéreo.

C1. 5.2 VARIANTES PATOGÉNICAS O PROBABLEMENTE PATOGÉNICAS EN GENES IMPLICADOS EN PREDISPOSICIÓN A CÁNCER

El estudio presentado en este capítulo se centró inicialmente en la búsqueda de variantes descritas como patogénicas o probablemente patogénicas en genes conocidos de predisposición a cáncer[280], así como en otros descritos en la literatura como potencialmente implicados en diferentes procesos y etapas de la carcinogénesis en distintos tipos de neoplasias. Este análisis reveló que sólo 2 de los pacientes estudiados (MUB3 y MUB4) presentaron variantes patogénicas en genes con una implicación a nivel germinal ya descrita en cáncer.

Por un lado, en el paciente MUB3, se detectó la variante p.V617F en el gen *JAK2*, recurrentemente descrita a nivel somático en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas[281]. Esta variante también ha sido descrita a nivel germinal en algunos pacientes y, se ha sugerido su implicación en la predisposición genética frente a este tipo de neoplasias hematológicas[282]. Sin embargo, el paciente que mostró esta variante (MUB3) no presentaba historial de enfermedad hematológica alguna en el momento de este estudio. Por lo que, o bien la variante se encontraba a nivel germinal o en el caso de tratarse de una variante somática, es posible que la paciente todavía no fuese diagnosticada. De todos modos, las pruebas de una relación entre la presencia de esta mutación y el desarrollo de un MUB en este momento son escasas teniendo en cuenta la información actualmente disponible. Además, esta variante no ha sido asociada con ningún otro tipo de neoplasia diferente de las hematológicas, hasta la fecha, por lo que lo más probable es que se trate de un hallazgo secundario.

El otro gen implicado en cáncer en el cual se detectó una variante patogénica en el paciente MUB4, fue *TERF2IP*. En el presente estudio se consideró como el principal gen candidato basándonos en diferentes niveles de evidencia que se comentarán a continuación.

El paciente MUB4 mostró en este gen la variante nula p.Arg364*, descrita como patogénica en relación a predisposición frente al desarrollo de MMC[283], siendo este gen considerado, en la actualidad, como uno de los genes de riesgo moderado en la predisposición a MMC familiar[284]. De acuerdo a lo indicado en la bibliografía, las familias que presentan mutaciones en *TERF2IP* muestran un elevado riesgo frente al desarrollo temprano de múltiples tipos de melanoma y también parecen estar enriquecidas en otros tipos de cáncer primario como el de mama, pulmón, cuello uterino, colon, intestino, ovario, o el linfoma de células B. Esto sugiere que las mutaciones en este gen predisponen a un espectro más amplio de cánceres que al MMC[284]. Hasta donde llega nuestro conocimiento, nunca antes se habían vinculado al desarrollo de un MU y menos aún al de un MUB primario.

Si nos remitimos al estudio de la comparación de la frecuencia de variantes nulas en población control frente al grupo MUB, a pesar de que este gen se mostró mutado únicamente en el paciente MUB4,

vemos que la incidencia en pacientes resultó significativamente incrementada respecto a la población control (OR:915,63: IC 95% 19,72-8192; p-valor = 0,00128), lo cual indicaría una posible asociación de variantes patogénicas en este gen con el desarrollo de un MUB.

En nuestro estudio, la variante identificada en *TERF2IP* se encontró en el paciente que también desarrolló un cáncer de mama primario durante el trascurso del mismo (MUB4), hecho que de entrada no fue considerado como una coincidencia. Ya que, como se ha mencionado, mutaciones en este gen y específicamente la mutación aquí descrita p.Arg364*, ha sido directamente relacionada con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, incluyendo el MMC y el cáncer de mama en una familia con varios miembros afectados y donde la variante cosegregaba con la enfermedad[283].

Cabe resaltar que en el mismo paciente que mostró la variante en *TERF2IP* (MUB4), se detectó una variante de significado incierto en el gen *RAD54L*. Este gen codifica para una proteína recombinante asociada con RAD51, que participa en la reparación por escisión de nucleótidos en la ruptura de doble cadena, la recombinación meiótica y que fue propuesta como proteína supresora de tumores en varios tipos de cáncer, pero cuya implicación en el cáncer de mama resulta controvertida. Aunque en algunas bases de datos clínicas como HGMD se describieron como patogénicas variantes de tipo *missense* en relación a cáncer de mama y cáncer en general, en estudios como el publicado por Pelttari et al., se sugiere que no hay relación entre el desarrollo de cáncer de mama hereditario y la presencia de mutaciones germinales en *RAD54L*[285]. Por ello, la variante identificada en este gen fue clasificada como de significado incierto en el presente estudio y se consideró que parecía más probable que tanto el MUB como el cáncer de mama desarrollados por la paciente pudieran asociarse a la mutación identificada en el gen *TERF2IP*. Este hecho suscitó la idea de que este gen podría mostrar un mecanismo de acción similar, por tanto, al del gen *BAP1* y otros supresores tumorales, para el cual mutaciones germinales explicarían la coocurrencia de varios tipos de cáncer primario en un mismo paciente[211].

Por otra parte, es necesario mencionar que *TERF2IP* codifica para una proteína miembro de la *shelterina telomérica*, un complejo proteico

que actúa protegiendo los extremos de los cromosomas mediando la interacción de la telomerasa con los telómeros[286]. Este complejo, está formado, además, por otras proteínas codificadas por 6 genes (*POT1, ACD, TPP1, TINT1, PIP1* y *PTOP*) que son colectivamente necesarias para todas las funciones de los telómeros, incluida la protección de los mismos contra la degradación, la recombinación aberrante y el proceso correcto de reparación del ADN[286].

Recientemente, un estudio publicado por Nathan et al. describió la posible asociación de variantes con pérdida de función en el gen *POT1* con la predisposición genética frente al MU primario[84], un hecho que, nuevamente, suma evidencias para la posible implicación del gen *TERF2IP* en la aparición del MUB descrito en el paciente MUB4. Además, se ha descrito la existencia de un síndrome de predisposición a tumores asociado al gen *POT1*, donde se incluyen neoplasias como sarcomas, gliomas y MMC, entre otros[287]. Estudios funcionales llevados a cabo en los pacientes con MU y mutaciones germinales en el gen *POT1* demostraron que estos pacientes presentaban telómeros más largos en comparación con los individuos control de la misma edad[84], algo similar a las observaciones que previamente se habían descrito en el caso de pacientes con mutaciones en este gen asociadas a MMC y otros tipos de cáncer[287]. Por lo que no resulta descabellado que las mutaciones en *TERF2IP* puedan estar asociadas a un nuevo síndrome de predisposición a tumores que incluya el MU en su espectro fenotípico, como ya hemos teorizado con anterioridad, dado que la observación de la misma variante germinal en este gen en pacientes afectados de distintos tipos de cáncer, sugiere un papel más amplio para el mismo en la predisposición a cáncer.

La secuencia de todos los genes implicados en la formación del complejo *shelterina* fue analizada en los cuatro pacientes estudiados para detectar la posible presencia de variantes potencialmente patogénicas, aunque sin éxito. De manera específica, en el gen *TERF2IP* no se encontraron variantes patogénicas, probablemente patogénicas o de significado incierto en los tres pacientes restantes. No pudiendo descartarse la presencia de variantes con posible efecto deletéreo en regiones reguladoras o regiones intrónicas profundas de alguno de estos genes, no evaluadas mediante esta técnica. Aun así,

consideramos que el desarrollo de un MUB y un cáncer de mama en el mismo paciente, junto con la publicación de la detección de la misma mutación en una familia con diferentes tipos de cáncer primario y la asociación de mutaciones de pérdida de función en el gen *POT1* con el desarrollo de MU, sugiere que la idea de la existencia de un posible nuevo síndrome de predisposición a cáncer vinculado a la presencia de variantes deletéreas en *TERF2IP*, podría no ser anecdótica. Es preciso mencionar que, por el momento, en la familia de este paciente, no se reportaron otros casos de cáncer, por lo que podría tratarse de una mutación originada en la paciente en cuestión o bien implicar una penetrancia incompleta, de estar presente en otros familiares.

Algo importante que también conviene comentar, es que el gen *TERF2IP* se encuentra ubicado en la región cromosómica 16q23.1, una región en la cual se han detectado pérdidas de manera recurrente, a nivel somático, en el MU[288]. Por ello, sería interesante poder estudiar si existe una pérdida de heterocigosidad para este gen que pudiese suponer su inactivación completa a nivel tumoral. Desafortunadamente, en el caso de esta paciente, no se disponía de muestra tumoral de ninguno de los MU, por lo que no pudo comprobarse la pérdida o inactivación del otro alelo a nivel tumoral. Aunque, esto podría no ser del todo determinante, ya que en el caso del gen *POT1* se vio que no eran necesarias dos mutaciones inactivantes para que ese gen actuase como supresor tumoral, sino que la pérdida de función en una sola copia era suficiente para desencadenar una predisposición genética frente a determinados tipos de tumores incluidos en el espectro del síndrome asociado a variantes patogénicas en *POT1*[84].

Con todo esto, el estudio del gen *TERF2IP* en cohortes más grandes de pacientes con MU y si fuese posible con MUB, podría ayudar a dilucidar si existe una contribución real del mismo a la predisposición frente al desarrollo del MU, tal y como se ha podido demostrar para otros tipos de cáncer[283]. En el caso de que pudiese demostrarse esta asociación, nuestros hallazgos podrían ser empleados a nivel clínico para el seguimiento y monitorización de otros pacientes portadores de mutaciones en *TERF2IP*.

C1. 5.3 Otras variantes patogénicas descritas con posible interés

En el paciente MUB1, se detectó en heterocigosis la variante p.R275W (rs34424986) en el gen *PARK2*, ya descrita en las principales bases de datos clínicas y en la bibliografía en relación a enfermedad de Parkinson juvenil autosómica recesiva tipo 2 (OMIM 600116)[261]. Curiosamente, mutaciones en este gen también han sido descritas en relación a diferentes tipos cáncer tanto a nivel somático como a nivel germinal. De hecho, la misma variante que la encontrada en el paciente MUB1, se asoció, en heterocigosis, a susceptibilidad familiar para adenocarcinoma de pulmón. En esta investigación se vio que, en una familia con numerosos casos de cáncer de pulmón, la variante cosegregaba con la enfermedad. El estudio fue replicado en más familias afectadas por este tipo de neoplasia y en tres más se detectó cosegregación de variantes en *PARK2* con la enfermedad, elevando la evidencia de su posible selección como gen candidato a susceptibilidad frente a ciertas variantes de carcinoma de pulmón[289].

El gen *PARK2*, está implicado en muchas funciones biológicas relacionadas con el crecimiento y la supervivencia celular, procesos involucrados a su vez en diferentes etapas de la carcinogénesis. De hecho, en un estudio publicado recientemente, se describió el papel de este gen como supresor tumoral, actuando como regulador principal de las distintas ciclinas implicadas en las fases G1 y S del ciclo de división celular, por lo que mutaciones que suponen una pérdida de función para este gen han sido descritas en distintos tipos de cáncer[290]. La región cromosómica 6q25.2-q27, que incluye la ubicación del gen *PARK2*, constituye una amplia extensión cromosómica que a menudo sufre pérdidas en distintos tipos de cáncer[291]. En el caso del MU, también se han descrito de manera recurrente pérdidas en el brazo largo del cromosoma 6, que muestran, además, valor pronóstico en la enfermedad[292]. La mutación p.R275W, se encuentra en el dominio funcional RING finger 1, crucial para la función de la proteína PARK2 como supresor tumoral, y estudios funcionales han determinado que esta sustitución supone una pérdida de función de la proteína[293,294]. En la base de datos COSMIC, se han descrito mutaciones puntuales en esta misma posición en distintos tipos de cáncer y, de hecho, la aquí hallada

se encontró en MMC (COSMIC Id: COSM1722444). Además, en la bibliografía se ha sugerido que los pacientes afectados de Parkinson, aunque parecen tener una menor incidencia de cáncer que el resto de la población, para ciertos tipos de neoplasias como MMC o cáncer de mama, parecen tener un riesgo incrementado[295]. No obstante, en estos momentos, a nuestro parecer no hay evidencias suficientes de la implicación de la variante identificada en la causalidad de un MUB, ya que, entre otras características, la frecuencia con la que esta variante está presente en población control (0,3%) es muy superior a la que cabría esperar en relación a la incidencia descrita para el MUB en población general e incluso para un MU. Aunque no puede obviarse su posible implicación tanto a nivel germinal como somático en otros tipos de cáncer y, por ello, no puede descartarse que en un contexto de posible interacción multigénica, las mutaciones en este gen pudiesen contribuir al desarrollo del MU. El hallazgo de esta variante y su posible implicación en cáncer, también resultó de interés debido a los hallazgos obtenidos años atrás por la URQTIA y el grupo de investigación en Tumores Intraoculares del Adulto del IDIS de Santiago de Compostela, que implican a la oncoproteína PARK7 (DJ-1) en la proliferación e invasión de las células del MU en cultivo y, por tanto, a las rutas de señalización asociadas a la enfermedad de Parkinson, como biomarcador de transformación de nevus oculares benignos a MU[141].

C1. 5.4 VARIANTES PRIORIZADAS COMO PROBABLEMENTE PATOGÉNICAS

Algunas de las variantes seleccionadas como potencialmente candidatas, se encontraron en genes que de alguna manera podrían estar implicados en cáncer tanto a nivel somático como a nivel germinal.

Las variantes priorizadas como probablemente patogénicas se detectaron en los genes *ATR*, *BAX*, *LZTS1*, *RBBP8*, *PREX2* y *TP63*. En todos los casos se trató de variantes no descritas previamente en población control o con una frecuencia extremadamente reducida como es el caso de las identificadas en los genes *ATR*, *LZTS1* y *PREX2*. A excepción de las variantes detectadas en los genes *BAX* y *RBBP8*, ambas con potencial pérdida de función de la proteína resultante, el resto fueron de tipo *missense* y las predicciones *in silico* indicaron en todos los casos que podrían tener un efecto deletéreo sobre las proteínas sintetizadas.

En el estudio de la comparación de la frecuencia de variantes patogénicas en los genes priorizados, entre la cohorte control y pacientes con MUB, se vio que la incidencia de alteraciones potencialmente patogénicas era significativamente mayor en los pacientes que en la población control no-cáncer para todos los genes estudiados, pero mostrando el gen *ATR* una mayor significación debido a la detección de 2 variantes distintas en dos de los pacientes (MUB1 y MUB3). La detección simultánea de estas variantes en dos pacientes distintos podría ser una simple coincidencia teniendo en cuenta que la variante detectada en el paciente MUB3 no parecía tener un claro efecto patogénico sobre la proteína, o bien un enriquecimiento real de variantes en este gen en pacientes con predisposición genética frente al MUB.

El gen *ATR*, está implicado en el proceso de reparación de daños en el ADN, y de acuerdo a la literatura, alteraciones en el mismo parecen influir en la heredabilidad de tipos específicos y raros de cáncer, como el orofaríngeo[296,297]. Se ha visto que las mutaciones de *ATR* causan una respuesta defectuosa frente a los daños en el ADN, lo que da lugar a trastornos como el síndrome de telangiectasia cutánea canceroso familiar y el síndrome de Seckel, que se caracterizan por defectos en el desarrollo, sensibilidad a los daños del ADN y predisposición a cáncer[298,299]. Sin embargo, los estudios de las mutaciones germinales en *ATR* respecto a la susceptibilidad a cáncer, han sido generalmente inconsistentes e inconclusos, a lo cual hay que sumar que una de las variantes identificadas en este trabajo se clasificó como de significado incierto ante la falta de evidencia de su posible efecto patogénico sobre la proteína sintetizada. Por todo ello, nuevamente, el estudio de la presencia de variantes en este gen en cohortes mayores de pacientes podría resultar informativo de acuerdo a su posible papel en el desarrollo de un MUB y un MU, valorando que, además, éste se encuentra localizado en el cromosoma 3.

Cabe resaltar, del mismo modo, la existencia de una interacción entre el gen *ATR* y otros genes en los cuales se han detectado variantes con posible interés clínico en este estudio. Este es el caso de los genes *POLN* y *RBBP8*, ambos también involucrados en vías de reparación de ADN, lo cual podría apoyar la implicación de rutas de reparación del

ADN alternativas en la etiología de esta enfermedad y no sólo de los mecanismos de reparación asociados a *BAP1*. Además, recientemente se ha descrito que el gen *ATR*, podría servir como un marcador pronóstico potencial en pacientes con MU y como un objetivo terapéutico potencial dada la observación de que se encuentra silenciado a nivel somático en un importante porcentaje de MU, especialmente en aquellos que muestran otros factores clínicos o moleculares de riesgo metastásico[300].

En el gen *BAX* se detectó una deleción que provoca una ruptura de la pauta de lectura y como consecuencia se espera la formación de una proteína truncada. Este gen, localizado en el cromosoma 19q13.33, codifica para una proteína pro-apoptótica esencial para la disfunción mitocondrial, un mecanismo necesario para la muerte celular en respuesta a diversos estímulos y una proteína que es activada directamente por p53 actuando como un gen pro-apoptótico[301]. De hecho, los experimentos de pérdida de función en este gen han demostrado que la ausencia de la proteína BAX preserva las mitocondrias e inhibe la apoptosis celular[302]. Por sus funciones, algunos autores han postulado que las mutaciones puntuales en *BAX* podrían conferir una predisposición al cáncer causando un fenotipo similar al síndrome de Li-Fraumeni. No obstante, Barlow et al., sugirieron que las alteraciones germinales en *BAX* no eran responsables del desarrollo de tumores en familias con fenotipo similar al propio del síndrome Li-Fraumeni que carecían de mutaciones en *p53*[303]. Un estudio publicado con posterioridad, informó de la presencia de una mutación en línea germinal en el gen *BAX* en un paciente que presentaba tanto un MMC como un tumor estromal gastrointestinal. Por ello, sugirieron, contrariamente, que eran necesarias más investigaciones para tratar de responder a si las alteraciones germinales en *BAX* constituyen un factor de riesgo frente a ciertos tipos de cáncer incluyendo el MMC[304].

La proteína BAX está involucrada en múltiples vías relacionadas con el cáncer, incluidas las rutas de señalización implicadas en el desarrollo del melanoma, la ruta de señalización asociada a p53 y la ruta de apoptosis (KEGG). De hecho, se ha descrito que puede estar alterada en varios tipos de cáncer, como las neoplasias gastrointestinales o hematológicas[305]. Otra cuestión interesante sobre este gen es que está

vinculado al proceso de melanogénesis, actuando como regulador del mismo en los melanocitos de origen cutáneo[306]. Aunque, se desconoce su posible efecto sobre la melanogénesis en melanocitos de la úvea, por lo que sería interesante su estudio teniendo en cuenta que ambos tipos celulares tienen un origen embriológico común[100]. En bases de datos como UniProt y Human Protein Atlas, se ha visto que existen distintas isoformas proteicas, de las cuales algunas muestran expresión en el ojo, especialmente en células del epitelio pigmentario de la retina y en coroides[266]. Por todo ello, el gen *BAX* podría ser un buen candidato para explicar la susceptibilidad genética frente al MUB. El estudio de mutaciones en este gen a nivel tumoral sería crucial para confirmar o descartar su posible actuación en el desarrollo de estos tumores y en estos momentos, aun postulándose como un buen candidato, la evidencia de su implicación en la causalidad del MUB resulta todavía limitada.

Otro de los individuos (MUB1), mostró una variante de tipo no sinónima, en heterocigosis, no descrita en población control en el gen *RBBP8.* Las predicciones *in silico* indicaron que podría tener un efecto truncante en la proteína sintetizada, pudiendo ocasionar cambios en el procesamiento del ARNm. En concreto, la variante detectada afecta al dominio N-terminal-Proteína supresora de tumores CtIP, que parece actuar como supresor tumoral en la misma vía de señalización que el gen *BRCA1*[301]. De hecho, la proteína codificada por este gen se asocia a BRCA1 y se ha postulado que actúa modulando sus funciones de regulación de la transcripción, reparación de ADN y control del ciclo celular[307]. Variantes en *RBBP8* se han detectado a nivel germinal en análisis de predisposición frente a otros tipos de cáncer como el de mama y ovario en población española. No obstante, en los mismos se sugirió que eran necesarios más estudios de caso-control para determinar con exactitud la posible implicación de *RBBP8* en el desarrollo de esos tumores[308]. Posteriormente, en un estudio publicado en 2020 por Zarrizi et al. se vio que existía un enriquecimiento de variantes germinales raras en *RBBP8* en mujeres con desarrollo temprano de cáncer de mama. Además, propusieron que las variantes germinales en este gen actuaban controlando la integridad de las horquillas de replicación en el ADN, llevando al desarrollo de cáncer

de mama temprano por una pérdida de los mecanismos de protección de dichas horquillas[309].

Más allá del cáncer de mama y ovario, la alta prevalencia de mutaciones en el gen *BAP1* en el MU, sugiere un papel biológico relevante de la vía asociada a la proteína BRCA1 en este tumor. De hecho, además de las mutaciones en *BAP1*, en el MU se describió, puntualmente, la existencia de casos asociados a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*[269]. Otra asociación que cabe resaltar, es la implicación de este gen en la ruta de señalización de la proteína RB, comúnmente inactivada en el MU[310,311]. En el año 2004 Pardo et al. ya habían secuenciado toda la región codificante del gen *RB1* sin detectar ninguna mutación que explicase la ausencia de funcionalidad de la proteína Rb en el MU, sugiriendo la necesidad de un mecanismo alternativo[159]. Y, aunque en algunos estudios se postuló que dicha inactivación se debía a la hipermetilación del promotor del gen *CDKN2A*, se vio que este mecanismo epigenético no explicaba la totalidad de los casos[310,311]. Por todo ello, la relación del gen *RBBP8* con las rutas de señalización asociadas a *BRCA1 y RB1*, podría hacer de éste un interesante gen candidato a predisposición frente al MUB. Sin embargo, en estos momentos la evidencia de su implicación resulta todavía limitada. Por lo que se requieren estudios de validación en otras cohortes de pacientes con sospecha de predisposición genética frente a MU, así como estudios funcionales que permitan determinar si existe relación, o no, entre las variantes patogénicas en este gen y el desarrollo de un MU.

En el caso del gen *LZTS1*, se detectó, en el paciente MUB2, una variante *missense* con una frecuencia extremadamente reducida en población control y potencialmente patogénica. Las evidencias que apoyan su postulación como posible gen candidato radican, por un lado, en las variantes previamente reportadas en tres pacientes con sospecha de susceptibilidad genética para MU en un estudio de secuenciación de exomas para la búsqueda de genes de predisposición a MU[82]. El gen *LZTS1* codifica para una proteína con función de supresor tumoral que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos del cuerpo incluida la úvea, y cuya expresión parece estar enriquecida en células pigmentadas como los melanocitos[312]. A nivel somático, esta proteína se silencia en

los tumores de metástasis rápida, pero tiene una expresión normal en MU de metástasis lenta y en los no metastásicos. Por esa razón, se ha propuesto como supresor metastásico en MU[313].

El gen *LZTS1* se encuentra en el cromosoma 8p22, una región cromosómica con pérdida de heterocigosidad recurrente en varios tipos de cáncer, incluido el MU. Así pues, la presencia de una alteración germinal inactivante en este gen y una inactivación somática secundaria del mismo, cumplirían la hipótesis del "doble hit" de Knudson, donde se indica que ambas copias de un gen necesitan ser mutadas para que se produzca un tumor asociado a los genes supresores de tumores recesivos que conducen a síndromes de susceptibilidad a cáncer heredados de forma dominante[314]. Lamentablemente, en este estudio no se disponía de muestra tumoral de ninguno de los MU de este paciente para su análisis.

Otro dato a tener en cuenta, es que la variante identificada fue de tipo *missense*, por lo que, en ausencia de estudios funcionales, no puede predecirse que cause una pérdida de función en la proteína sintetizada. En un estudio llevado a cabo por Hawkins et al. se vio que variantes germinales en *LZTS1* se asocian con un riesgo incrementado de padecer cáncer de próstata[315]. En pacientes afectados de MU primario, se ha descrito una mayor prevalencia a padecer otros tipos de cáncer primario, siendo el de próstata uno de los más prevalentes[316,317], otra observación que podría apoyar a la postulación de este gen como un posible candidato a la susceptibilidad frente al MU, o, al menos, a la contribución al desarrollo del mismo. Aunque, no tuvimos conocimiento de que el paciente MUB2 desarrollase algún otro tipo de tumor primario.

En el gen *TP63,* localizado en el cromosoma 3, se detectó en el paciente MUB3 una variante no descrita en población control y con predictores que indicaban patogenicidad. Este gen codifica para una proteína perteneciente a la familia de los factores de transcripción p53 y en colaboración con la proteína p73, podría actuar activando los procesos de apoptosis dependientes de p53[301]. Además, parece estar implicada en la regulación de la morfogénesis epitelial y, aunque presenta un patrón generalizado de expresión, ciertas isoformas se expresan de manera preferencial en mama, próstata, ojos y piel[301]. A

nivel germinal, mutaciones en *TP63* se han asociado con diferentes tipos de síndromes relacionados con el desarrollo y la morfogénesis de múltiples tejidos epiteliales[318]. Entre otros fenotipos en humanos, se ha relacionado con presencia de nevus melanocíticos, alteraciones de la morfología uveal, alteraciones en la morfología del iris, aplasia/hipoplasia de la úvea, desarrollo de pecas o hiperpigmentación cutánea[319]. Además, variaciones en la expresión de la proteína p63 se han asociado con distintos tipos de cáncer, lo cual llevó a la hipótesis de que este gen podría actuar como un supresor tumoral al igual que *TP53*. Sin embargo, las mutaciones en *TP63* en cáncer son raras, por lo que algunos autores descartaron su papel como supresor tumoral[320]. De hecho, se vio que en modelos de ratones heterocigotos para p63 nulo, el desarrollo esporádico de tumores era raro[320]. Y, aunque no hay que obviar que este gen se localiza en la región cromosómica 3q27-q28, frecuentemente alterada en múltiples tipos de cáncer al igual que ocurre en el caso del MU[144], su posible implicación germinal en cáncer todavía está por descubrir[321]. Cabe resaltar, no obstante, que en un trabajo publicado en el año 2016 por Awais et al, se vio que la pérdida de función de p63 suponía la interrupción de la apoptosis asociada a p53 en el MU[322]. Haciendo una valoración conjunta de toda la información recabada, por el momento la evidencia de su posible designación como gen candidato, resulta insuficiente.

Por último, el gen *PREX2*, también ha sido seleccionado como sospecha de gen candidato en el paciente MUB1. Este gen se ha descrito como recurrentemente mutado en ciertos tipos de melanoma como el cutáneo o el mucoso y codifica para una proteína que interactúa con PTEN, regulando negativamente su actividad fosfatasa, la cual es necesaria para el control del ciclo celular[323]. El supresor tumoral PTEN, aunque no mutado, se encuentra comúnmente inactivado en MU y, teniendo en cuenta que una de las funciones de PREX2 es regular su expresión, no parece muy arriesgado pensar que mutaciones en el gen *PREX2* puedan alterar dicha regulación. Sin embargo, por el momento, no se conoce si existe una posible implicación entre la presencia de mutaciones germinales en el gen *PREX2* y el desarrollo de algún tipo de melanoma o de otros tipos de cáncer. Así, todavía resulta muy escasa la evidencia de su implicación en predisposición frente a MUB.

C1. 5.5 ESTUDIO DE LAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO

C1. 5.5.1 Genes implicados en rutas de señalización de cáncer

La observación de la presencia simultánea de otras variantes de significado incierto raras, extremadamente raras o no descritas en genes claramente implicados en predisposición a cáncer como *SMAD4*, *PDGFRA* y *APC*, otros genes relacionados con cáncer como *EWSR1*, o genes que participan en rutas de reparación de daños en el ADN como *HELQ*, *RAD54L* o *RECQL4*, sugiere por un lado la idea de un posible origen multigénico de este tipo de tumores para algunos pacientes, donde el efecto sinérgico de múltiples variantes de bajo o moderado riesgo podría estar actuando. Por lo que la hipótesis de la existencia de una combinación perfecta de variantes raras en genes específicos que genere la composición genética necesaria para el desarrollo bilateral de un MU, podría no ser algo arbitrario valorando la extremada rareza con la que estos tumores se presentan en la población.

Actualmente, sabemos que el gen *BAP1* es el único que muestra una evidencia definitiva de asociación de predisposición frente al MU[82,214,215,324]. Pero, también sabemos que las mutaciones germinales en este gen no sólo predisponen a MU si no que se asocian al síndrome de predisposición a tumores asociado a *BAP1*[77]. Sin embargo, cuál es el mecanismo por el que siendo portadores de una misma variante en este gen los individuos desarrollan un tipo u otro de tumor, todavía se desconoce. En este contexto, inicialmente, parecería lógico pensar que el tipo de mutación y el dominio funcional de la proteína afectado tuviesen consecuencias funcionales y patológicas distintas, sin embargo, se han identificado todo tipo de mutaciones en pacientes en las distintas variedades de cáncer incluidas en el espectro de este síndrome[211,218]. Por ello, algunos autores sugieren que el desarrollo de un tipo u otro de neoplasia podría deberse a una combinación distinta de variantes en otros genes que podrían determinar cursos distintos de la enfermedad[211]. Es decir, la idea radicaría en que, en presencia de una misma mutación de penetrancia incompleta y expresividad variable, el fondo genético de cada individuo determinaría la variedad de tumor desarrollada. En este contexto, en un estudio recientemente publicado y llevado a cabo en 80 921 individuos con el objetivo de evaluar la influencia del fondo genético de cada individuo sobre ciertas patologías

como el cáncer de mama y ovario hereditario o el síndrome de Lynch, se propuso que tener en cuenta el fondo poligénico parece incrementar la fiabilidad en la estimación del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades aparentemente monogénicas, pudiendo modificar la penetrancia y expresividad de variantes genéticas de elevado riesgo[325]. No obstante, es necesario tener en cuenta que las patologías valoradas en ese estudio, a diferencia de lo que ocurre con el MU, son más comúnmente diagnosticadas en la población, por lo que parece más razonable considerar que variantes comunes puedan estar influyendo en el desarrollo de una patología frecuente y no tanto en el de neoplasias de extremada rareza como es el caso del MUB primario.

Algo que también vimos en los pacientes estudiados en este apartado y que resultó de interés, fue que las variantes de significado incierto que se detectaron en genes conocidos relacionados con el cáncer, estaban principalmente localizadas en genes asociados a neoplasias de tipo digestivo (*APC*, *SMAD4*, *RAD54L* o *PDGFRA*). A pesar de ello, ninguno de los pacientes estaba afectado de un cáncer digestivo ni tampoco presentaron antecedentes familiares. Como ya se ha mencionado, se han publicado numerosos estudios que evalúan la incidencia de otros tipos de cáncer primario en pacientes con MU. El publicado por Heussen et al. describe una mayor incidencia de ciertos tipos de cáncer como el de próstata, colon, mama, el linfoma o ciertos cánceres inespecíficos de la piel[316]. Más recientemente, se ha sugerido que los pacientes afectados de un MU primario tienen un riesgo un 9% superior de desarrollar una segunda neoplasia posterior al desarrollo del MU, que incluso alcanza el 20% a los 5 años del diagnóstico, siendo la existencia de un factor genético común no identificado una de las posibles explicaciones para la elevada incidencia[317]. De hecho, algunas de las variantes germinales descritas en la literatura como asociadas al desarrollo de un MU, se ubican en genes que también confieren riesgo frente a otros tipos de cáncer[82,83]. Así, siguiendo con la hipótesis explicada con anterioridad, por un lado, no podemos descartar el hecho de que estas variantes puedan contribuir al desarrollo del MU. También podría tratarse de hallazgos secundarios del estudio, sin riesgo para el desarrollo de estos tumores digestivos, pero que en cualquier caso no estarían, *a priori*, implicados en el desarrollo del MU.

En el caso concreto del gen *APC*, se ha visto que la presencia de variantes patogénicas en el mismo, comúnmente asociadas a poliposis adenomatosa familiar y otros tumores desmoides, también están relacionadas con otros fenotipos caracterizados por manifestaciones extracolónicas como la hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina[326]. No hay datos en la bibliografía que relacionen este fenotipo ocular con el MU y, aunque es uno de los especímenes a descartar en el diagnóstico diferencial de un MU, los especialistas en oncología ocular diferencian claramente ambos tipos de tumores mediante un examen clínico sin necesidad de recurrir a una biopsia. La variante detectada en este gen, no ha sido descrita en población control, pero existen referencias a la misma en la base de datos clínica ClinVar, donde es clasificada como variante de significado incierto en relación a poliposis adenomatosa pero también en relación a síndrome hereditario de predisposición a cáncer. Por todo ello, con la información recogida, esta variante no se descartó de manera inicial en relación al desarrollo del MUB en el presente estudio, aunque se mantuvo como VUS y bajo la necesidad de profundizar en el estudio de su posible contribución a la causalidad del MUB.

C1. 5.5.2 Genes implicados en rutas de reparación de daños en el ADN

Finalmente, respecto a las variantes de significado incierto identificadas en genes relacionados con rutas de reparación de ADN (*HELQ, RAD54L, POLN, RECQL4*), resultaron de especial interés las ubicadas en los genes *POLN* y *RECQL4*, este último considerado, además, uno de los genes clásicos de predisposición a cáncer[280].

En el gen *POLN*, se detectó en el paciente MUB4, la presencia de una deleción *frameshift* que podría actuar causando un efecto truncante sobre la proteína sintetiza. Esta deleción no fue previamente descrita en bases de datos clínicas ni poblacionales. El gen *POLN*, codifica para la polimerasa Nu, una enzima que participa en distintas rutas de reparación del ADN y que, además, interacciona de manera directa con otras proteínas implicadas en las mismas como BRCA1 o ATR[327]. En humanos, se ha visto que la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las enzimas polimerasas conlleva un incremento en el

riesgo del desarrollo de ciertos tipos de tumores[328]. Sin embargo, el papel del gen *POLN* en el cáncer todavía no está muy claro. De hecho, en un estudio publicado recientemente centrado en la búsqueda de genes de predisposición a cáncer de mama, se describe el hallazgo de una variante *missense* probablemente patogénica en una familia con varias mujeres afectadas de cáncer de mama donde la variante cosegregaba con la enfermedad, pero la contribución de este gen a la predisposición frente al cáncer de mama no se corroboró en la fase replicativa[329]. Posteriormente, en un estudio llevado a cabo en población china, se sugirió que la presencia de mutaciones en este gen incrementaba el riesgo de padecer cáncer de próstata[330].

Por otro lado, la presencia de variantes polimórficas en el gen *POLN* se ha asociado en la bibliografía con un incremento de la predisposición frente a MMC en familias con una alta incidencia de dicho cáncer y en las que no necesariamente existen mutaciones en genes de alto riesgo como *CDKN2A*[331]. Asimismo, deficiencias en *POLN*, podrían asociarse con manifestaciones fenotípicas como *Xeroderma Pigmentosum,* una afección genética con herencia autosómica recesiva, que determina una sensibilidad extrema de la piel y los ojos frente a la radiación UV y, por tanto, una incrementada predisposición frente al cáncer de piel debida a un déficit en los mecanismos de reparación de daños en el ADN causados por la luz UV. Dicha asociación, radica en que, en mamíferos, la proteína POLN es fosforilada por la quinasa ATR tras la exposición a luz UV, mecanismo necesario para garantizar la reparación de daños en el ADN[332].

El X*eroderma pigmentosum* se describió en la literatura como un factor de riesgo para el desarrollo de MMC y también de melanomas malignos oculares, especialmente asociado al melanoma de iris. En el año 1989 se publicó el caso de una paciente de 31 años afectada de esta patología y que además presentaba un melanoma maligno de iris de una extraordinaria extensión[57]. En nuestro estudio, la paciente que mostró la variante en *POLN* (MUB4), fue sometida a una iridociclectomía en el ojo donde se le detectó el primer MU dada la afectación existente del iris y el cuerpo ciliar. Además, como se ha indicado, esta paciente desarrolló un cáncer de mama primario durante el transcurso de este estudio. Cabe mencionar que el valor estimado para la intolerancia

frente a variantes con pérdida de función para este gen en GnomAD (pLI = 1,14), resulta superior al que cabría esperar para un gen donde las mutaciones con pérdida de función actúan como mecanismo de patogenicidad y donde, por tanto, se observan valores cercanos a 0 para esta métrica. Por consiguiente, en este momento, no podemos justificar que por sí sola la variante detectada en este gen pueda ser la única responsable del fenotipo, y encontrándose en la paciente donde ya se identificó una variante patogénica que podría explicar, en gran medida, el MUB, su designación como único gen candidato resulta poco probable, no pudiendo descartarse una posible contribución al fenotipo aportando un riesgo bajo o moderado y, por todo ello, se mantuvo como variante de significado incierto.

El paciente MUB2, mostró una variante de significado incierto en el gen *RECQL4* no descrita en las bases de datos poblacionales. Este gen junto a otros como *RECQL*, *BLM*, *WRN* y *RECQL5*, codifican para un tipo de helicasas dedicadas a mantener la integridad del genoma y, de hecho, se ha descrito que variantes patogénicas en estos genes se asocian a trastornos de inestabilidad cromosómica caracterizados por una incidencia temprana de fenotipos de envejecimiento y cáncer[333]. En el estudio de secuenciación de exomas para búsqueda de nuevos genes de predisposición a MU publicado recientemente, lo autores incluyen la descripción de una variante truncante en el gen *RECQL4*[82]. Sin embargo, la variante que identificamos en nuestro trabajo es de tipo *missense* y, teniendo en cuenta que el mecanismo de patogenicidad asociado a este gen radica en la pérdida de función, en ausencia de estudios funcionales, la variante detectada se mantuvo como de significado incierto en relación a la patología en el paciente MUB2.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 2: BIOPSIA PRONÓSTICA EN EL MELANOMA UVEAL: ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C2. 1. INTRODUCCIÓN

C2. 1.1 BIOPSIA PRONÓSTICA EN EL MELANOMA UVEAL

En la mayor parte de los tumores intraoculares, el diagnóstico se basa generalmente, en el examen clínico rutinario y pruebas de imagen, sin la necesidad de recurrir a la ejecución de biopsias con fines diagnósticos como ocurre en otros tipos de tumores sólidos. Como vimos en la introducción general de esta tesis doctoral, aproximadamente un 50% de los pacientes diagnosticados de MU acaban desarrollando metástasis, fundamentalmente hepática, y el desenlace acostumbra a ser fatal en menos de un año[50]. Sin embargo, en el momento del diagnóstico, tan sólo el 1% de los pacientes presentan lesiones extraoculares y, por ello, ser capaces de predecir el avance de la enfermedad resulta primordial.

Históricamente, el riesgo de metástasis en los pacientes con MU se predecía únicamente en base al estudio de las características morfológicas y patológicas del propio tumor. Pero el avance de los estudios moleculares, ha permitido determinar que ciertos factores citogenéticos y genéticos pueden mostrar claros indicios de cuál será el curso evolutivo de la patología. En este aspecto, los avances en este campo han hecho que la biopsia pronóstica en el MU haya cobrado importancia y se haya ido incorporando en la rutina de las principales unidades de oncología ocular a nivel mundial.

El objetivo de este procedimiento, supone la identificación de pacientes con alto riesgo de enfermedad metastásica para poder incrementar la frecuencia de los rastreos metastásicos, el tratamiento quirúrgico precoz de las lesiones metastásicas, el desarrollo de terapias adyuvantes sistémicas dirigidas y la posible inclusión de los pacientes en ensayos clínicos[334]. Pero, además, este procedimiento permite la obtención de tejido tumoral fresco que puede ser empleado en investigación. Este último factor, resulta de gran importancia, ya que contribuye al avance del conocimiento molecular en el MU con la

preservación del globo ocular en los pacientes. Además, para llevar a cabo estudios de tipo molecular se requieren purezas celulares elevadas, especialmente cuando se trabaja con muestras de baja celularidad y en este aspecto, la incorporación de técnicas intraoperatorias como la biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) (Figura 16), han resultado de gran utilidad. Así, en el MU las técnicas moleculares con finalidad pronóstica pueden llevarse a cabo, no sólo en muestras tumorales obtenidas tras enucleación y endorresección, habiendo demostrado numerosos estudios una elevada correlación entre los resultados citogenéticos en ejemplares obtenidos por BAAF y los derivados del estudio directo de fragmento tumoral[335].

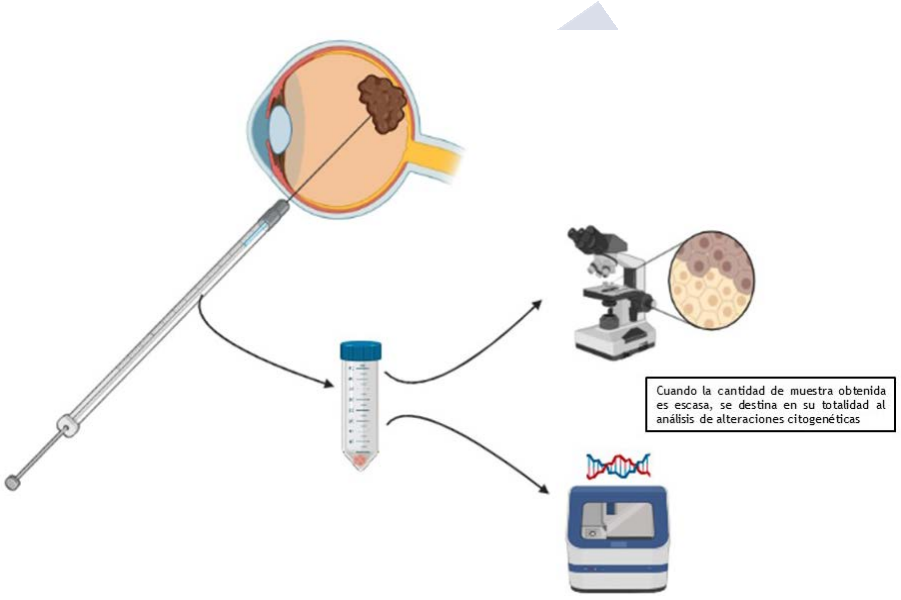


Figura 16: Esquema representativo de una biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) (Imagen propia creada con BioRender.com[45]**, autorizada para tesis**).

La biopsia pronóstica, presenta sus propias limitaciones que conviene tener presentes. Algunas son inherentes a la propia técnica, ya que la biopsia puede ser difícil de ejecutar y, además, los resultados obtenidos pueden tener una compleja interpretación. Dentro de las limitaciones, se encuentra la posibilidad de poder obtener un falso negativo por una escasa celularidad tumoral, especialmente en tumores de pequeño diámetro o cuando existe una elevada heterogeneidad

tumoral[336-340]. De hecho, se ha descrito que una de las principales limitaciones de la BAAF en tumores de pequeño tamaño es la incapacidad para obtener suficientes células tumorales que permitan llevar a cabo el estudio pronóstico[341]. Por ello, cuando existe un resultado negativo, no debe ser considerado, como definitivo e inequívoco de que no exista un proceso de malignidad intraocular.

A las citadas limitaciones, hay que sumar las posibles complicaciones derivadas del procedimiento intraoperatorio. A modo de ejemplo, una de las principales complicaciones que se ha barajado a lo largo de las últimas décadas y sobre la cual existe cierta controversia, hace referencia al riesgo de extensión extraocular de las células malignas como consecuencia de la realización de la biopsia intraocular. Ya que, aunque se ha documentado algún caso donde se detecta extensión epiescleral[342] después de la biopsia, esta complicación es rara.

C2. 1.1.1 Alteraciones citogenéticas

En la gran mayoría de los principales tipos de cáncer conocidos, se ha descrito la presencia de aneuploidía y alteraciones estructurales a nivel cromosómico. En ciertas neoplasias, el tipo de alteraciones cromosómicas detectadas es altamente específico de la patología, mientras que en otros el espectro de alteraciones encontradas es muy variable.

En el caso del MU, las investigaciones a nivel citogenético que comenzaron en torno a los años 1990 por medio de estudios de cariotipo convencional[147,343,344], mostraron que a diferencia de lo que ocurre en otros tipos de cáncer incluyendo el MMC, el espectro de alteraciones cromosómicas detectadas era reducido, recurrente y específico, implicando a los cromosomas 1, 3, 6 y 8[146,147] (Tabla 24). Después de estas observaciones, algunos autores como Prescher et al. sugirieron en el año 1992 que las alteraciones detectadas en los cromosomas 3 y 8q se relacionaban con el pronóstico de la enfermedad[345]. Hipótesis que años más tarde, confirmaron en una cohorte de 52 pacientes afectados de MU donde el 56% mostró M3 y, de ellos, a los 3 años el 57% había desarrollado enfermedad metastásica, mientras que ninguno de los pacientes con dosis normal para el cromosoma 3 había desarrollado metástasis[346]. Tan solo un año más tarde, en otro estudio publicado por

Sisley et al. se presentaron resultados similares, donde en 42 tumores analizados, el 50% mostraban M3 y el 54% de los casos duplicación del brazo largo del cromosoma 8[143]. Posteriormente, la presencia de estas alteraciones se ha ido confirmando en múltiples estudios llevados a cabo por numerosos grupos en cohortes independientes y bajo el empleo de distintas tecnologías que se comentarán posteriormente en este capítulo.

Alteración cromosómica	Frecuencia
pérdida 1p	28–34%
ganancia 1q	24%
pérdida 3	50-61%
ganancia 6p	28-54%
pérdida 6q	35-37%
pérdida 8p	17-28%
ganancia 8q	36-63%

Tabla 24: Frecuencia de las alteraciones cromosómicas más comunes en el MU. Tabla adaptada de Clinical Ophthalmic Oncology-Uveal Tumors por Damato y Singh; Springer Ed (Tercera Edición, 2019)[18].

Se cree que algunas de estas alteraciones ocurren en estadios tempranos de la enfermedad, y otras en fases más tardías antes de la diseminación del tumor. De modo que, en base al tipo de alteraciones citogenéticas y genéticas acumuladas en el MU, se distinguen dos tipos fundamentales de riesgo:

- **Tumores de bajo riesgo:** caracterizados por la presencia de disomía 3 acompañada por ganancia en los cromosomas 6p y 8q, con bajo riesgo de transformación maligna.
- **Tumores de alto riesgo:** caracterizados por presentar M3, pérdida de las regiones 1p y 8p y ganancia de 8q, con alto riesgo de metástasis.

Actualmente, la inclusión de nueva información de carácter genético y epigenético, ha puesto de manifiesto que la clasificación dicotómica podría resultar demasiado simple para explicar el comportamiento de estos tumores de cara a su evolución clínica y posible progresión metastásica[18]. Por ello, entre otros hallazgos relevantes, la detección de mutaciones puntuales en determinados genes que se comentarán con detalle en el capítulo 3 de esta tesis doctoral, han permitido que estos dos grandes grupos hayan ido desglosándose en distintos subgrupos de riesgo en base a perfiles moleculares más específicos[155]. De hecho, algunos autores sugirieron que el modelo dicotómico basado en la distinción de dos tipos de tumores en cuanto a riesgo era demasiado simple e introdujeron el concepto de heterogeneidad clonal en el MU[162]. Damato et al. habían descrito ya en el año 2010 la existencia de una gran diferencia en cuanto a la presencia de anomalías cromosómicas, lo cual podría ser resultado, según su hipótesis, de que algunas alteraciones podrían ocurrir antes que otras[334]. Este comportamiento, daría lugar a la existencia de poblaciones celulares con distintas alteraciones cromosómicas en un mismo MU, teniendo capacidad algunos de estos clones para sobrepasar a otros.

C2. 1.1.1.1 Cromosoma 3

La monosomía del cromosoma 3 (M3), es la alteración cromosómica recurrente más frecuente en el MU, descrita en aproximadamente un 50-60% de los casos y de manera predominante en MU que acaban metastatizando[143,147,341,343,345-347]. Se trata de una alteración cromosómica altamente específica del MU, y raramente descrita en otros tipos de melanoma o cáncer[348].

La mayor parte de los MU, pierden una copia completa del cromosoma 3, pero un pequeño porcentaje muestra pérdidas parciales que implican a sólo uno de los dos brazos del cromosoma, o a regiones muy localizadas del mismo. La prevalencia de la monosomía parcial oscila entre un 4%-8%[349-351] y un 30%[145] en distintos estudios. En la literatura, se ha descrito que la M3 se asocia con alto riesgo de metástasis en el MU y con una reducción de la probabilidad de supervivencia a 5 años de entre un 100% y menos de un 50%[346,347,352]. Se sabe que dicha aneuploidía se relaciona con otros factores clínicos e

histopatológicos con valor pronóstico en el MU incluyendo un diámetro tumoral amplio, implicación del cuerpo ciliar, el tipo celular epitelioide, alto índice mitótico, redes vasculares y extensión extraocular del tumor[100].

Otra de las alteraciones que implica al cromosoma 3 y que se ha descrito con cierta frecuencia en el MU (5-8%), es la presencia de isodisomía adquirida para el citado cromosoma. Es decir, la existencia de dos copias idénticas de un mismo cromosoma 3. Dicha alteración se originaría por pérdida de una copia completa del cromosoma 3 y duplicación de la copia remanente. Según algunos estudios, a nivel funcional, la isodisomía del cromosoma 3 se comporta de manera similar a la M3 en cuanto al pronóstico de la enfermedad[353,354].

C2. 1.1.1.2 Cromosoma 1

Las pérdidas en el brazo corto del cromosoma 1 (1p) se han descrito de manera recurrente en aproximadamente un 30% de los MU[355]. En varios tipos de tumores derivados de la cresta neural, las alteraciones en la región cromosómica 1p se han asociado con cáncer avanzado y enfermedad metastásica, incluido el MMC.

En el MU, algunos autores sugirieron una relación estadísticamente significativa entre la presencia de pérdidas en el cromosoma 1p y los melanomas del cuerpo ciliar, asociados, generalmente, a un pronóstico menos favorable de la enfermedad[356]. La concomitancia de las pérdidas en el cromosoma 1p y 3, parece mostrar una correlación más fuerte con metástasis que cualquiera de las dos alteraciones por separado[355].

C2. 1.1.1.3 Cromosoma 6

En el MU, se han descrito dos tipos de alteraciones recurrentes que implican al cromosoma 6 y que conllevan papeles contrarios en cuanto al pronóstico de la enfermedad. Por un lado, se ha descrito que las ganancias en el brazo corto del cromosoma 6 (6p) muestran una relación inversa con la metástasis actuando como indicador de buen pronóstico. Aunque, algunos autores sugieren que este efecto podría deberse a que esta alteración es mutuamente excluyente con la M3[357,358]. Ocasionalmente se ha descrito la coexistencia de ganancias en 6p con otras alteraciones asociadas a mal pronóstico como la M3 o

las ganancias en el cromosoma 8q. Sin embargo, los MU con este perfil citogenético presentan mejor pronóstico que aquellos que carecen de ganancias en 6p[357]. De acuerdo con estos hallazgos, se ha especulado la posible existencia de genes en esta región cromosómica que puedan estar ejerciendo un efecto protector[359], pero no se ha identificado ningún gen candidato que explique el comportamiento biológico favorable de estos tumores.

En un escenario contrario, se encuentran las pérdidas en el brazo largo del cromosoma 6 (6q), generalmente asociadas a un pronóstico más adverso y detectadas en aproximadamente un 30% de los MU[360].

C2. 1.1.1.4 Cromosoma 8

En el cromosoma 8, se han detectado pérdidas y ganancias que implican a los brazos corto y largo del mismo, respectivamente. Ambos tipos de alteraciones se han descrito como asociados con un mayor riesgo de metástasis[147,357,358,361].

Las ganancias en el cromosoma 8q, muestran una incidencia aproximada del 40% en el MU y, frecuentemente, esta alteración coexiste con la M3, confiriendo un peor pronóstico que el asociado a ambas alteraciones por separado[292,334,357,362]. Siendo la tasa de mortalidad a los 5 años del 6% en ausencia de alteración cromosómica, del 31% con la ganancia del cromosoma 8q y del 66% con la ganancia de 8q y M3[363]. De hecho, al igual que ocurre con la M3, las ganancias en 8q están asociadas con características clínicas e histopatológicas con valor pronóstico[100].

La región cromosómica 8q contiene potenciales oncogenes como *ASAP1* o *NBN* que muestran sobreexpresión en los MU con mal pronóstico[360]. Además, en la región 8q24-q25 se encuentra ubicado el oncogén *MYC*, amplificado en aproximadamente un 30% de los MU[364].

En algunos casos, se ha detectado la presencia de un isocromosoma 8q, es decir, la pérdida del cromosoma 8p y la duplicación de 8q en un mismo cromosoma, en coexistencia con la M3 en un 45% de los tumores[343]. La pérdida del cromosoma 8p también ha sido detectada de manera aislada como factor pronóstico independiente asociado a mal pronóstico en el MU[313,365].

C2. 1.1.1.5 Otras alteraciones cromosómicas

En algunos estudios se ha descrito la presencia de alteraciones que implican a otros cromosomas como el 11, el 21 e incluso el cromosoma Y, a pesar de que el MU, a diferencia de otros tumores sólidos, no suele mostrar un elevado espectro de alteraciones cromosómicas. Sin embargo, no está claro si dichas alteraciones se asocian con etapas específicas del desarrollo del tumor o con un pronóstico específico de la enfermedad[356].

Más recientemente, también se han descrito alteraciones en el cromosoma 16, especialmente pérdidas en la región cromosómicas 16q en un 16% de los MU[288] y alcanzando hasta un 30% en otras cohortes de pacientes donde, además, se observó en correlación con los MU metastásicos[366].

C2. 1.2 TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO APLICADAS EN LA BIOPSIA PRONÓSTICA EN MELANOMA UVEAL

A lo largo de las décadas, se han empleado distintas técnicas para el estudio de las alteraciones genéticas con valor pronóstico en el MU. En la literatura, se han descrito dos grandes vertientes a nivel mundial seguidas en las distintas unidades de oncología ocular en cuanto al tipo de estudio genético con fines predictivos; los test dedicados al estudio de alteraciones cromosómicas y los basados en el estudio de perfiles de expresión de genes concretos con significado clínico en el MU.

A continuación, se detallan distintas técnicas para el estudio de alteraciones genéticas con valor pronóstico en MU (Tabla 25).

C2. 1.2.1 Estudio de alteraciones cromosómicas

C2. 1.2.1.1 Citogenética convencional

Los primeros estudios llevados a cabo en el MU a nivel genético se basaron en la aplicación de la citogenética clásica, es decir, en el estudio del cariotipo convencional[343,344], una técnica que permite la identificación de alteraciones estructurales y numéricas en los cromosomas de las células tumorales. Las principales limitaciones de estas técnicas radican en la necesidad de expertos citogenetistas que puedan interpretar la información obtenida en las imágenes del cariotipo, la posibilidad de un error de muestro elevado debido al

análisis de un número reducido de células tumorales o la incapacidad para detectar cambios de pequeño tamaño u otros inapreciables al ojo humano, como la isodisomía del cromosoma 3[367].

C2. 1.2.1.2 Marcaje mediante sondas

Otras técnicas para el estudio de alteraciones cromosómicas basadas en el análisis directo de los cromosomas son la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), el cariotipo espectral (SKY) o la hibridación genómica comparada (CGH). Todas se basan en el empleo de sondas marcadas dirigidas a regiones cromosómicas específicas, proporcionando la ventaja, frente al cariotipo, de no depender de la morfología cromosómica para identificar las alteraciones[367].

Al igual que en el estudio de cariotipo, estas técnicas pueden verse limitadas por un error de muestro debido al análisis de un reducido número de células tumorales[338,339] y tampoco permiten la detección de la isodisomía del cromosoma 3. De modo que, todas ellas mostrarían una baja resolución. Aunque, algunas como la FISH, continúan siendo extensamente empleadas en centros de oncología ocular.

C2. 1.2.1.3 Estudio de ADN

En la actualidad, la mayor parte de las técnicas disponibles se centran en el estudio del ADN y se basan, mayoritariamente, en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Rection; PCR). Entre ellas se incluyen: el array-CGH, el análisis de microsatélites (MSA), la amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (del inglés, Multiple Ligation dependent-Probe Amplificatio; MLPA), o el análisis de polimorfismos de nucleótido único (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism-Array; SNP-array)[367]. Todas se basan en el estudio del ADN tumoral y no de células individuales, logrando un análisis mucho más global. Por ello, recurriendo a estas técnicas se reduce notablemente el error de muestreo en comparación con las anteriormente descritas y, además, aumentan la capacidad de detección de anomalías de pequeño tamaño.

Con el MSA y los SNP-array, es posible la detección de regiones con pérdida de heterocigosidad (del inglés, Loss of heterozygosity; LOH), permitiendo diferenciar, mediante el estudio de polimorfismos,

entre las dos copias de un cromosoma concreto heredadas de cada progenitor y, por tanto, la identificación de isodisomía 3[354].

De todas las técnicas descritas, una de las más empleadas a nivel europeo en la actualidad, de acuerdo a la literatura, es el MLPA, que permite llevar a cabo una cuantificación relativa de múltiples *loci* ubicados en los cromosomas 1p, 3, 6 y 8 en una sola reacción. La aplicación de esta técnica para el estudio de muestras procedentes de MU fue descrita por Damato et al. en 2009, en un estudio donde analizaron muestra tumoral procedente de 73 pacientes y donde detectaron asociación entre la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas y la supervivencia de los mismos[357] (Tabla 26). En un estudio posterior llevado a cabo por el mismo grupo, se vio que los datos obtenidos por MLPA se correlacionaban con las características clínico-patológicas con valor pronóstico del tumor[334]. De manera que, ambos trabajos fueron los pioneros en demostrar que el MLPA proporciona información relevante acerca de las alteraciones cromosómicas en los pacientes con MU.

En la actualidad, esta técnica es comercializada por la empresa biotecnológica MRC Holland como SALSA® MLPA® Probemix P027-Uveal melanoma (MRC-Holland; http://www.mlpa.com).

Sin embargo, el MLPA también presenta sus propias limitaciones, mostrando una precisión limitada en tumores con una elevada heterogeneidad[368], así como la incapacidad para detectar regiones de LOH como la isodisomía 3.

C2. 1.2.2 Estudio de expresión génica

Otra de las técnicas moleculares más extendidas para estudiar el pronóstico del MU es la basada en el perfil de expresión génica (del inglés, Gene Expression Profiling; GEP) de 15 genes (12 con valor pronóstico y 3 genes referencia), que permite la distinción entre tumores con alto riesgo de metástasis (clase 2) y tumores con bajo riesgo de metástasis (clase 1)[369]. Esta técnica requiere la extracción de ARNm procedente de las muestras tumorales.

Los tumores pertenecientes a la clase 1 han sido subdivididos en tumores de clase 1A y tumores de clase 1B, con un riesgo de metástasis a cinco años del 2% y el 21%, respectivamente. En contraste, los

tumores de clase 2, tienen un 72% de riesgo de metástasis a los cinco años[150] (Tabla 26).

Respecto a la heterogeneidad tumoral, cuando ésta es elevada, el GEP muestra limitaciones en cuanto a su precisión, llegando a ocasionar una discordancia en la clasificación de acuerdo al pronóstico de hasta un 11,3%[370].

En la actualidad, el GEP ha sido patentado y es comercializado para su uso en la práctica clínica bajo el nombre de DecisionDx-UM® (Castle Biosciences, Tucson, AZ)[371]. Y es mayoritariamente empleada en las unidades de oncología ocular localizadas en Norte América.

Técnica	Tecnología	Alteraciones detectadas	Otras observaciones
Cariotipo	Análisis macroscópico de los 23 pares cromosómicos de una célula, por bandeo cromosómico	grandes ganancias y pérdidas, alteraciones cromosómicas numéricas/estructurales	baja resolución para ganancias o pérdidas pequeñas poca precisión con heterogeneidad no válido para muestras parafinadas
FISH	sondas marcadas con fluorescencia que hibridan al ADN en regiones específicas.	ganancia o pérdida de regiones cromosómicas	baja resolución para ganancias o pérdidas pequeñas poca precisión con heterogeneidad no válido para muestras parafinadas
CGH	combinación de hibridación en competencia con fluorescencia *in situ*	ganancia o pérdida de regiones cromosómicas	baja resolución para ganancias o pérdidas pequeñas poca precisión con heterogeneidad
MSA	PCR específica para análisis de microsatélites	Detección de LOH en regiones de ADN muy polimórficas alteraciones numéricas, ganancias y pérdidas	permite la detección de regiones con LOH
Array-SNP	cariotipo de base molecular basado en el estudio de SNPs repartidos a lo largo de todo el genoma	LOH mediante el estudio de puntos polimórficos, detección de pérdidas, ganancias y alteraciones numéricas	Alcanza una mayor resolución para la detección de CNVs de pequeño tamaño y en regiones con LOH
MLPA	amplificación	ganancia o pérdida de	no permite detectar

	mediante PCR de regiones de ADN tras hibridación con sondas	múltiples fragmentos	LOH, menos precisión en situaciones de heterogeneidad tumoral
GEP	expresión de ARNm mediante técnicas de PCR	medida simultánea de la expresión del ARNm procedente de 15 genes	limitación en casos de heterogeneidad tumoral, preferiblemente aplicada en muestras de tejido fresco

Tabla 25: Tabla resumen de las técnicas moleculares más empleadas en el estudio del perfil genético del MU. Se mencionan las principales ventajas y limitaciones asociadas a cada técnica.

MÉTODO	**RIESGO DE MORTALIDAD A LOS 10 AÑOS**	
MLPA	Disomía del cromosoma 3	0%
	Monosomía del cromosoma 3	55%
	Monosomía del cromosoma 3 + ganancia 8q	72%
GEP	**RIESGO DE MORTALIDAD A LOS 5 AÑOS**	
	Clase 1A	2%
	Clase 1B	21%
	Clase 2	72%

Tabla 26: Resumen del riesgo de metástasis a 5 años identificado mediante el empleo de las dos técnicas moleculares aplicadas, por excelencia, al estudio de alteraciones genéticas con valor pronóstico en el MU[150,334].

C2. 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

- Caracterizar los distintos tipos genéticos de MU partiendo de la identificación de alteraciones cromosómicas con valor pronóstico en esta patología.

- Establecer asociaciones entre las alteraciones cromosómicas detectadas en los MU analizados y las características clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio, con el fin de establecer subgrupos pronóstico de pacientes que podrían beneficiarse de un cambio en la frecuencia y periodicidad de su seguimiento, protocolos de tratamientos con terapias adyuvantes, y/o su posible inclusión en futuros ensayos clínicos.

- Instaurar e impulsar el estudio sistemático, mediante MLPA, como método de evaluación rápido, económico, sensible y reproducible de las alteraciones cromosómicas con valor pronóstico en el MU, en ADN extraído a partir de fragmentos tumorales tomados tras enucleación, endorresección o muestra tumoral fresca obtenida por BAAF.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C2. 3. MATERIALES Y MÉTODOS

C2. 3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

C2. 3.1.1 Criterios de inclusión

- Diagnóstico de MU en la URQTIA del servicio de oftalmología del CHUS.
- Consentimiento informado firmado por cada paciente incluido en el estudio.
- Muestra de ADN tumoral disponible en cantidad y calidad suficiente para el estudio de MLPA en la FPGMX.
- Muestra de ADN tumoral procedente de MU primario obtenida antes del tratamiento local del tumor.
- Datos epidemiológicos y de seguimiento incluidos en el estudio actualizados para cada individuo en el momento del análisis de los resultados.

Los datos clínicos fueron recogidos y anonimizados por los miembros de la URQTIA y fueron: edad, sexo, fecha de diagnóstico, tratamiento recibido, fecha de tratamiento, fecha de diagnóstico de enfermedad sistémica, localización de las lesiones metastásicas y supervivencia.

Las muestras de ADN tumoral fueron extraídas en la FPGMX a partir de tejido tumoral fresco. De cada una, se evaluó la concentración y calidad seleccionando las que cumplieron los parámetros necesarios para llevar a cabo el MLPA.

C2. 3.1.2 Criterios de exclusión

- Ausencia de consentimiento informado firmado por el paciente.
- ADN tumoral insuficiente o de escasa calidad para llevar a cabo el estudio de MLPA.
- Datos epidemiológicos y de seguimiento necesarios para llevar a cabo el estudio, incompletos.

C2. 3.2 PACIENTES Y MUESTRAS

Se incluyeron en el estudio un total de 89 pacientes diagnosticados y tratados de MU primario entre los años 2015-2020 en la URQTIA de Santiago de Compostela. El estudio se inició en el año 2015 en colaboración con la FPGMX. A pesar de que en la actualidad continúa, los resultados reflejados en este capítulo hacen referencia a muestras estudiadas entre el 14 de octubre de 2015 y el 5 de octubre de 2020.

El diagnóstico clínico de estos pacientes se hizo sobre la base de un examen oftalmológico completo y ecografía ocular estandarizada. Las muestras de MU se obtuvieron, preferentemente, mediante BAAF antes del tratamiento local con braquiterapia, tras endorresección del tumor o por toma de fragmento tumoral tras enucleación.

Todas las pruebas genéticas se realizaron en la FPGMX, incluyendo la extracción de ADN tumoral y posterior estudio de las alteraciones cromosómicas.

Se registró la información clínica epidemiológica y patológica de referencia de los pacientes incluidos. Se obtuvo un consentimiento informado escrito de todos los individuos incluidos en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC) (Código de Registro:2009/128) (ANEXOS IV, VI).

C2. 3.3 EXTRACCIÓN DE ADN TUMORAL

El ADN tumoral se extrajo a partir de muestras tumorales frescas. Para ello, fue necesaria la incubación previa en buffer de lisis de los tejidos tumorales frescos, durante toda la noche, a 56ºC y en agitación hasta lograr una lisis completa de los tejidos. La preparación lisada obtenida, fue empleada para el aislamiento de ADN por medio de la tecnología de aislamiento y purificación de ADN CHEMAGEN® (Chemagic Magnetic Separator Module 1; Perkin Elmer), según las indicaciones aportadas por el fabricante.

Una vez obtenida la muestra de ADN tumoral, medimos la concentración y pureza determinando la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm, mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Minneapolis, MN). Se consideraron de buena calidad las muestras con valores de absorbancia de 1,8-2,0 para la ratio 260/280 y de entre 1,8-2,2 para la ratio de absorbancia 260/230. Los valores

situados por debajo de los considerados como indicadores de pureza, se asociaron a presencia de otros contaminantes en la muestra obtenida tras el proceso de extracción de ADN. El valor de la lectura a 230nm (longitud de onda mínima de absorbancia del DNA) está influenciado por la cantidad de sales presentes en la muestra y la longitud de onda a 280nm es específica para las proteínas. Consecuentemente, atendiendo a las relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230, se puede establecer el grado de pureza de la muestra. En las muestras de ADN tumoral procedente de MU, es probable que la ratio 260/230 resulte alterada por exceso de sales probablemente inherentes a la propia anatomía del ojo.

Cuando la calidad del ADN tumoral obtenido no resultó óptima, o cuando observamos la presencia de melanina en la muestra final, recurrimos a su purificación mediante el kit de purificación de ADN QIAamp DNA Micro Kit (50) (Qiagen, Hilden, Germany). Esta fase de purificación extra del ADN, se llevó a cabo únicamente en muestras que reunían una concentración mínima de 10 ng. Las muestras de ADN tumoral obtenidas, fueron guardadas a -20ºC hasta llevar a cabo el ensayo de MLPA.

C2. 3.4 ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS MEDIANTE MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

El MLPA es una técnica molecular basada en hibridación de sondas y posterior PCR que permite la detección de variaciones en el número de copia (del inglés, Copy Number Variation; CNVs) de modo semicuantitativo, en más de cuarenta regiones genómicas distintas en una única reacción.

Se trata de una variante de la técnica de PCR-multiplex que emplea sondas de 2 oligonucleótidos que reconocen zonas adyacentes en el ADN y que contienen una secuencia universal que permite la amplificación simultánea, de todas las sondas con una única pareja de cebadores. La reacción de MLPA se puede dividir en 5 etapas fundamentales:

- Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas
- Reacción de ligación
- Amplificación por PCR

- Separación de los productos de PCR por electroforesis capilar
- Análisis de los datos

Una de sus principales ventajas es la posibilidad de obtener resultados concluyentes empleando cantidades no muy elevadas de ADN (100 ng en 5 µL totales) y en tiempos de ejecución cortos (24-48 horas), sin precisar un gran equipamiento técnico; sólo un termociclador y un secuenciador basado en electroforesis capilar.

Para nuestro estudio se empleó el kit SALSA® MLPA® probemix P027-C1 y la variante actualiza P027-C2, comercializadas por MRC-Holland (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Este kit contiene 38 sondas de análisis y 12 sondas para regiones de referencia.

En todos los kits comercializados por el fabricante se incluyen, además, sondas que indican si los niveles de ADN son los adecuados (fragmentos Q) y sondas de control de desnaturalización (fragmentos D). La diferencia entre la versión actualizada P027-C2 y la versión P027-C1 radica en el reemplazamiento de 3 sondas de referencia y el ajuste en cuanto a longitud de numerosas sondas a estudio.

El protocolo seguido fue el proporcionado por el fabricante para todos los kits de MLPA, al cual añadimos pequeñas modificaciones para incrementar el éxito de los ensayos. Las modificaciones consistieron en un incremento del tiempo de desnaturalización inicial, pasando de 5 a 15 minutos a 98ºC, y una modificación en la temperatura de *annealing* de 60ºC a 65ºC, en la etapa de PCR.

Además de las muestras a estudio, en cada ensayo de MLPA incluimos muestras de ADN control extraídas bajo el mismo protocolo. Se recomienda que estas muestras procedan de individuos no relacionados y sin historia familiar de MU.

C2. 3.5 ELECTROFORESIS CAPILAR Y ANÁLISIS DE FRAGMENTOS

Después de llevar a cabo el proceso de MLPA, los fragmentos derivados del ensayo son caracterizados por electroforesis capilar en el secuenciador ABI3730 XL (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). La preparación de las muestras se ejecutó siguiendo el protocolo de MLPA sugerido por la casa comercial (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands http://www.mlpa.com).

Los datos obtenidos tras el proceso de electroforesis capilar fueron analizados con el software gratuito Coffalyer.net, siguiendo las recomendaciones de interpretación proporcionadas por el fabricante y teniendo en cuenta las específicas para el kit P027-Uveal Melanoma.

De acuerdo a estudios pioneros en la aplicación del MLPA con fines pronósticos en el MU[334,357], se consideró que los resultados obtenidos mostraban fiabilidad cuando el número de loci control situados dentro del rango normal era ≥6 y si la desviación estándar obtenida en el ensayo era <0,2. Los valores del cociente de dosis (del inglés, Dosage Quotients; DQ) valorados para cada locus, fueron categorizados del siguiente modo: deleciones ≤0,65, pérdidas en el límite 0,65-0,84, resultado normal o diploidía 0,85-1,14, amplificaciones en el límite 1,15-1,35 y amplificaciones >1,35 (Ver ejemplos en el ANEXO I).

C2. 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico se basó en una estadística descriptiva donde se aportaron tablas de frecuencias con los correspondientes porcentajes (para las variables cuantitativas) y las medias con sus correspondientes rangos o desviaciones típicas (para las variables cualitativas).

Para el estudio de la existencia de asociación estadística entre las distintas variables se llevó a cabo el siguiente análisis:

- En los casos en los cuales se comparaban dos variables cualitativas, se llevó a cabo análisis mediante el test de Chi-Cuadrado de Pearson (χ^2) o en su defecto el test exacto de Fisher (en tabla 2x2) cuando al menos uno de los valores esperados para alguna de las variables era <5.

- Las variables continuas o no paramétricas que no siguieran una distribución normal se compararon entre los grupos usando el test U de Mann-Whitney-Wilcoxon.
- El estudio de la supervivencia del tiempo hasta la metástasis y la muerte relacionada con la metástasis se analizó mediante el método de curvas de supervivencia Kaplan-Meier (prueba de rango logarítmico; Log-rank). Asimismo, se estudió la posible asociación de las distintas alteraciones cromosómicas y el riesgo de metástasis, valorando los resultados correspondientes a las curvas de supervivencia (en meses) para las distintas variables genéticas.

Para cualquiera de los análisis, los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando p-valor tomó valores inferiores a 0,05. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) así como herramientas estadísticas de Excel y la versión v4.0.3 del software gratuito R.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

C2. 4. RESULTADOS

C2. 4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

En este trabajo se analizaron muestras de tejido tumoral procedentes de 89 pacientes diagnosticados de MU primario. El 50,6% fueron mujeres (n=45) y el 49,4% (n=44) hombres. La edad media de los pacientes en el diagnóstico se situó en 65,49 años (rango, 35-91 años). La mayor incidencia de casos se detectó entre la sexta y la séptima décadas de vida (48,3%). La incidencia por debajo de la quinta década se situó en el 13,5% de los casos (Figura 17).

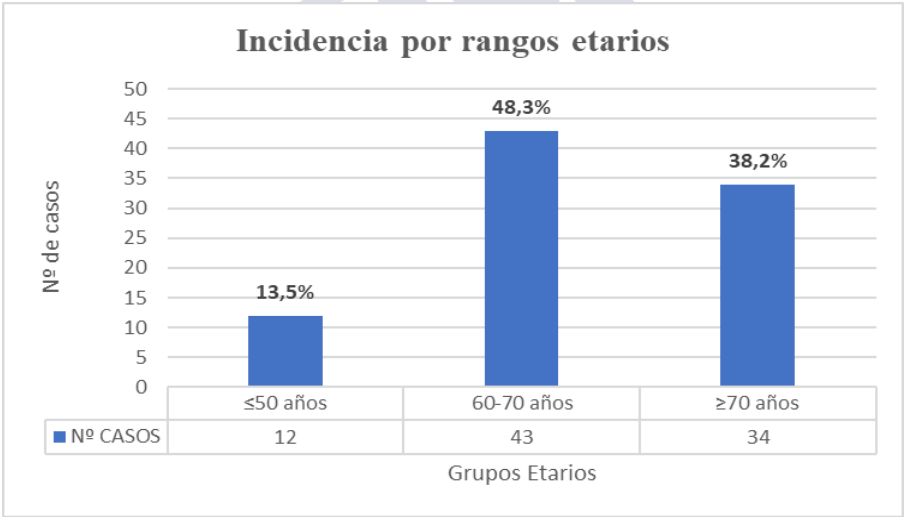


Figura 17: Distribución del número de casos de MU estudiados en los distintos grupos etarios.

El 82% de los MU estaban localizados a nivel de coroides (n=73), un 18% afectaban al cuerpo ciliar (n=16) y ninguno mostró afectación exclusiva del iris (Figura 18). En cuanto a la lateralidad del tumor, el 56,18% se localizaron en el ojo izquierdo (n=50) y el 43,82% afectaban al ojo derecho (n=39).

El 58% de las muestras tumorales fueron obtenidas mediante BAAF (n=52), un 33% a partir de fragmentos tumorales obtenidos tras enucleación (n=29) y un 9% procedía de muestra tomada tras endorresección (n=8) (Figura 19).

De los tumores que fueron estudiados en Anatomía Patológica, un 29% mostraron el tipo celular epitelioide (n=26), un 11% tipo celular mixto (n=10) y un 3% mostraron el tipo celular fusiforme (n=3). La altura media de los MU fue de 6,60 mm (rango, 1,2-15,05) y el diámetro de la base de 12,54 mm (rango, 6,61-19,12).

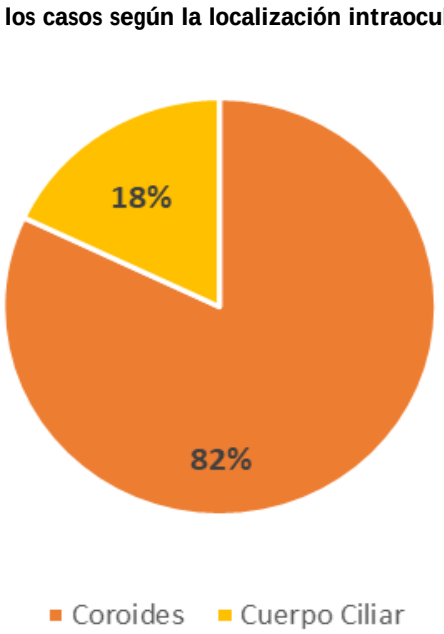


Figura 18: Distribución de los casos según la localización de los tumores en el tracto uveal.

Distribución de los casos según método de obtención de la muestra tumoral

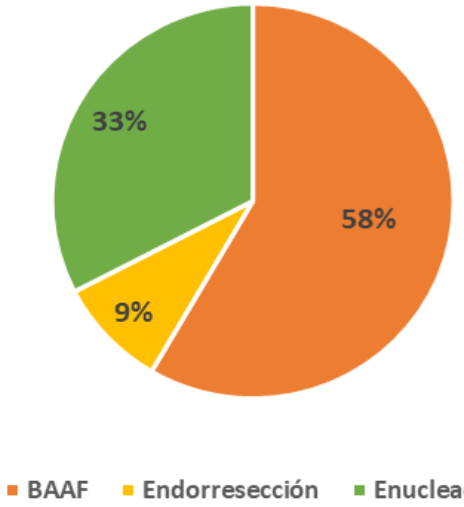


Figura 19: Distribución del número de muestras obtenidas mediante BAAF, endorresección y fragmento tumoral tras enucleación del globo ocular.

El tiempo de seguimiento medio de los pacientes desde su diagnóstico hasta el momento actual (enero 2021), hasta el desarrollo de enfermedad metastática o hasta su fallecimiento, fue de 34,54 meses (rango, 4,87-108,90).

El tratamiento local preferentemente elegido fue la Braquiterapia con ^{125}I (n=48), seguido de la enucleación (n=31), la endorresección del tumor (n=8) y 2 de los tumores estudiados fueron tratados con terapia ionizante con haz de protones en otras unidades de oncología ocular.

Durante el transcurso de este estudio, 12 pacientes (13,48%) desarrollaron metástasis y 3 pacientes (3,37%) presentaron recidiva local tras el tratamiento. Ocho pacientes fallecieron como consecuencia de la enfermedad metastásica.

Las principales características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas descritas en la cohorte estudiada se recogen con detalle en la tabla adjunta a continuación (Tabla 27).

		Cohorte (n = 89)	Estado del cromosoma 3		
			Disomía 3 (n = 44)	Monosomía 3 (n = 33)	n/a (n = 12)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Sexo	Femenino	45 (50,56%)	18 (40,91%)	17 (51,52%)	10 (83,33%)
	Masculino	44 (49,44%)	26 (59,09%)	16 (48,48%)	2 (16,67%)
Localización	Posterior	19 (21,35%)	7 (15,91%)	7 (21,2%)	5 (41,67%)
	Coroides	54 (60,67%)	31 (70,45%)	17 (51,52%)	6 (50%)
	Cuerpo Ciliar	16 (17,98%)	6 (13,64%)	9 (27,27%)	1 (8,33%)
Anatomía	Epitelioide	26 (29,21%)	14 (31,82%)	12 (36,36%)	0
	Fusiforme	3 (3,37%)	2 (4,55%)	1 (3,03%)	0
	Mixto	10 (11,24%)	5 (11,36%)	4 (12,12%)	1 (8,33%)
	n/a	50 (56,18%)	23 (52,27%)	16 (48,48%)	11 (91,67%)
Muestra	Fragmento	29 (32,58%)	16 (36,36%)	13 (39,39%)	0
	Endorresección	8 (8,99%)	4 (9,09%)	4 (12,12%)	0
	BAAF	52 (58,4%)	24 (54,55%)	16 (48,48%)	12 (100%)
Metástasis	Sí	12 (13,48%)	2 (4,55%)	10 (30,30%)	0
	No	77 (86,52%)	42 (95,45%)	23 (69,70%)	12 (100%)
Edad rango (años)		65,49 (35-92)	65,77 (38-92)	65,14 (42-91)	65,75 (35-86)
Base rango (mm)		12,54 (6,1-19,12)	12,60 (6,89-19,12)	12,82 (6,1-18,7)	12,42 (7,05-16,74)
Altura rango (mm)		6,60 (1,2-15,05)	6,65 (1,44-14,06)	6,75 (1,3-15,05)	6,50 (1,9-8,37)
Seguimiento rango (meses)		34,54 (4,87 -108,90)	37,09 (7,21-106,36)	29,65 (4,87-55,35)	28,61 (11,82-108,90)

Tabla 27: Resumen de algunas de las características, clínicas, epidemiológicas e histopatológicas de la cohorte de pacientes en estudio.

C2. 4.2 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

C2. 4.2.1 Rendimiento diagnóstico, prevalencia y distribución en la cohorte

El ensayo de MLPA resultó exitoso en el 86,5% de las muestras (n=77). Para el 13,5% (n=12) restante, no pudo obtenerse un resultado concluyente debido a la escasez de ADN tumoral obtenido o a la reducida calidad del mismo. De las 77 muestras, un 24,7% (n=19) no mostraron ninguna alteración cromosómica y el 75,3% presentaron de 1-6 alteraciones. El 100% de las muestras de ADN para las cuales no pudo obtenerse un resultado concluyente, fueron tomadas mediante BAAF. Sin embargo, no observamos diferencias entre muestras tomadas por endorresección o fragmento tumoral y muestras tomadas por BAAF en cuanto al rendimiento diagnóstico (p-valor = 0,123).

La distribución de todas las alteraciones cromosómicas detectadas en el estudio se muestra en la figura adjunta en el ANEXO II, donde se

aporta una representación esquemática e individualizada de las alteraciones cromosómicas halladas en los 89 MU estudiados. A continuación, se describen, por cromosoma, las alteraciones detectadas y su prevalencia.

C2. 4.2.1.1 Cromosoma 3

Pudo establecerse que el 37,1% de los pacientes estudiados presentaba M3 (n=33), y el 49,4% mostraba dosis normal para el cromosoma 3 (D3) (n=44) (Figura 20). Considerando únicamente las muestras con resultado exitoso en el MLPA (n=77), el porcentaje de pacientes con M3 (MU-M3) se situó en un 42,8% (33/77) y el de pacientes con disomía 3 (MU-D3) en un 57,2% (44/77).

Dentro del grupo MU-M3, se incluyeron tumores con M3 completa (n=26), M3 en mosaico (n=4) y tumores con M3-parcial (n=3). De los tumores con M3-parcial, 2 mostraron pérdida de la región 3p, y en el tercero se detectó pérdida exclusiva de las sondas dirigidas a los marcadores *VHL-2* y *VHL*-3 (3p25.3).

Del total de pacientes con M3 (n=33), 4 (12,1%) mostraron la pérdida de una copia del cromosoma 3 como única alteración cromosómica, mientras que el 87,9% restante mostraron entre 2 y 6 alteraciones cromosómicas distintas.

Distribución de los casos según el estado en el número de copia del cromosoma 3

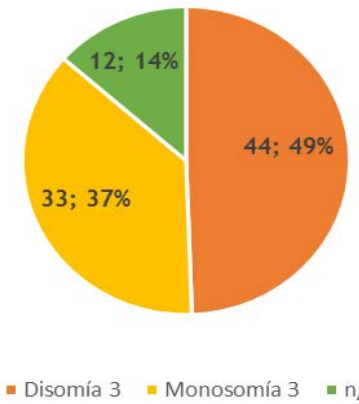


Figura 20: Distribución del número de casos de acuerdo al resultado obtenido en el MLPA para la dosis del cromosoma 3.

C2. 4.2.1.2 Cromosoma 1p

Se detectó pérdida de la región 1p en un 22,1% de los MU (17/77). En todos los casos, salvo en 3, las pérdidas implicaban a todos los marcadores incluidos para esta región. Los 3 casos con pérdida parcial de 1p, mostraron dosis normal para la región 1p12 (gen *NOCTH2*).

En su mayoría (14/17), las pérdidas en 1p se detectaron en tumores MU-M3 (p-valor = 0,0002) (Tabla 28).

C2. 4.2.1.3 Cromosoma 6

Un 40,3% (37/77) presentaban ganancias en la región 6p, algunas de ellas parciales (n=4). De las 4 muestras con ganancia parcial de 6p, 2 mostraron ganancia exclusiva de los marcadores *ECI2* (6p25.2) y *DCDC2* (6p22.3), y en las otras 2, la ganancia afectaba únicamente al marcador *ECI2*. Las ganancias en el cromosoma 6p, se detectaron mayoritariamente en tumores MU-D3 (p-valor = 0,013) (Tabla 28).

Un 23,4% (18/77) mostraron pérdidas completas o parciales de la región cromosómica 6q. En un 15,6% (12/77) de los casos se detectó coexistencia de ganancia en 6p y pérdida en 6q en la misma muestra, de los cuales 9 eran MU-D3.

C2. 4.2.1.4 Cromosoma 8

Un 50,6% de los MU (39/77) revelaron ganancia de 8q y un 11,7% (9/77) pérdida de 8p. Ambas, se detectaron en su mayoría en MU-M3 (8p: p-valor = 0,033; 8q: p-valor = 0,015) (Tabla 28).

Todos los MU con pérdida de 8p mostraron coexistencia con ganancia de 8q, y fueron mayoritariamente tumores MU-M3 (7/9). En 3 de los tumores con ganancia de 8q se detectó ganancia para los marcadores de la región 8p. En 5 de los 39 tumores con ganancia para 8q (12,8%), ésta fue parcial, afectando exclusivamente a los marcadores *ASAP1* (8q24.1), *MYC-1* (8q24.1) y *MYC-3* (8q24.1).

		Cromosoma 3				
		D3 (n=44)		M3 (n=33)		p-valor
		n	%	n	%	
Pérdida Cr 1	**Sí**	3	6,8	14	42,4	**0,0002 ***
	No	41	93,2	19	57,6	
Ganancia Cr 6p	**Sí**	23	52,3	8	24,2	**0,013 ***
	No	21	47,7	25	75,8	
Pérdida Cr 6q	**Sí**	10	22,7	8	24,2	0,88
	No	34	77,3	25	75,8	
Ganancia Cr 8q	**Sí**	17	2,3	22	66,7	**0,015 ***
	No	27	97,7	11	33,3	
Pérdida Cr 8p	**Sí**	2	4,5	7	21,2	**0,033 ***
	No	42	95,5	26	78,8	

Tabla 28: Estudio de la asociación del estado en cuanto al número de copia del cromosoma 3 (D3/M3) y la presencia de otras alteraciones cromosómicas.

C2. 4.2.2 Asociación monosomía 3 con las características clínicas e histopatológicas

Los tumores con M3 mostraron una altura mayor que los MU-D3 (p-valor = 0,031). En cuanto a la asociación con el diámetro basal del tumor, la localización intraocular del mismo (iris, coroides o cuerpo ciliar) o el tipo celular (fusiforme, epitelioide, mixto), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los MU-M3 y los MU-D3. Tampoco se detectaron diferencias para la prevalencia de la M3 entre hombres y mujeres o entre los distintos grupos etarios (Tabla 29).

		Estado del cromosoma 3								
		D3 (n = 44)				M3 (n = 33)				
		Media	Rango	n	%	Media	Rango	n	%	p-valor
Edad		65,8	(38-92)			65,14	(42-91)			0,33
EcoBI (Base mm)		12,6	(6,89-19,2)			12,82	(6,1-18,7)			0,17
EcoAl (Altura mm)		6,65	(1,44-14,06)			6,75	(1,3-15,1)			**0,031***
Sex	**Mujer**			18	40,9			17	51,5	0,11
	Hombre			26	59,1			16	48,5	
LOC	**Coroides**			38	86,4			24	72,7	0,13
	Cuerpo ciliar			6	13,7			9	27,3	
CEL	**Fusiforme**			2	4,55			1	3,0	0,91
	Mixto			5	11,3			4	12,1	
	Epitelioide			14	31,8			12	36,4	

Tabla 29: Asociación del estado del cromosoma 3 en cuanto al número de copia y las distintas características clínicas e histopatológicas. Sex: sexo; **LOC:** localización intraocular; **CEL:** tipo celular.

C2. 4.3 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MU METASTÁSICOS

Durante el tiempo de seguimiento establecido desde el momento del diagnóstico, 12/89 (13,48%) pacientes desarrollaron enfermedad metastásica. El 66,7% tenían sexo masculino (n=8). El tiempo medio desde el diagnóstico hasta el desarrollo de metástasis fue de 23,83 meses y osciló entre los 9 y los 47 meses.

En el 50% de los casos, las metástasis implicaron exclusivamente al hígado y en el 50% restante a múltiples localizaciones además del mismo (hueso, pulmón, bazo, tejido subcutáneo).

En el 75% de los pacientes con metástasis, el tumor se localizó a nivel del coroides, en el 25% implicó al cuerpo ciliar y en ninguno de ellos el MU se localizó a nivel del iris.

La mayor parte de los MU mostraron un patrón celular epitelioide (7/12, 58,3%) y sólo 3/12 (25%) mostraron patrón celular mixto. No se detectó ningún tumor con células fusiformes en los pacientes con metástasis, aunque en 2 casos (2/12; 16,7%) no se disponía de información acerca del tipo histológico.

Respecto al estado del cromosoma 3, la mayor parte de los pacientes con metástasis presentaron M3 (10/12; 83,3%) y sólo 2 MU-D3 (2/12; 16,7%) (Tabla 30). En los pacientes con D3, la edad media se situó en 68,62 (rango, 59-90 años), los tiempos de seguimiento medio

desde el diagnóstico y tratamiento hasta el desarrollo de las lesiones metastásicas fueron de 39,20 meses (rango, 27-35) y 27 meses (rango, 21-33), respectivamente.

En los pacientes con M3, la edad media se situó en 66,06 años (rango, 45-91) y los tiempos de seguimiento medio desde el diagnóstico y tratamiento de los MU hasta el diagnóstico de metástasis fueron de 41,85 meses (rango, 11-60) y 21,7 (rango, 8-46), respectivamente (Tabla 30).

En cuanto al tamaño de los tumores, la base y altura media de los MU-M3 fue de 13,01 mm (rango 11,5-18,7) y 7,04 mm (rango, 3,75-15,05), respectivamente. Mientras que en los pacientes con MU-D3, la altura media fue de 5,90 mm (rango, 3,17-8,51) y la base media de 12,11 mm (rango, 8,88-14,82) (Tabla 30).

En la tabla 31 se aporta una descripción detallada, individualizada, de todas estas características en cada uno de los pacientes que desarrollaron enfermedad metastásica (Tabla 31).

		Pacientes con metástasis (n = 12)	
		Disomía 3 (n=2)	Monosomía 3 (n=10)
		n (%)	n (%)
Edad (años)		68,62 (rango, 59-90)	66,06 (rango, 45-91)
Base (mm)		12,11 (rango, 8,88-14,82)	13,01 (rango, 11,5-18,7)
Altura (mm)		5,90 (rango, 3,17-8,51)	7,04 (rango, 3,75-15,05)
Tiempo diagnóstico-metástasis (meses)		39,20 (rango, 27-35)	41,85 (rango, 11-60)
Tiempo tratamiento-metástasis (meses)		27 (rango, 21-33)	21,7 (rango, 8-46)
Sexo	Masculino	1 (50%)	7 (70%)
	Femenino	1 (50%)	3 (30%)
Localización	Coroides	2 (100%)	6 (60%)
	Cuerpo Ciliar	0	4 (40%)
Anatomía	Epitelioide	2 (100%)	5 (50%)
	Fusiforme	0	0
	Mixto	0	3 (30%)
	n/a	0	2 (20%)
Muestra	BAAF	1 (50%)	2 (20%)
	Fragmento	1 (50%)	8 (80%)
	Endorresección	0	0

Tabla 30: Descripción detallada de las características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas de los pacientes con metástasis.

Id	SEXO	EDAD	LOC.	ANAT.	FECHA TRAT.	TRAT.	FECHA Mx.	LOC. Mx.	RIESGO	Éxitus
MU9	H	64,00	C	Epitelioide	14/12/2015	Proton Beam	17/11/2016	Hígado; suprarrenal; ósea; pulmón	alto	Si
MU12	H	79,00	CC	Mixto	28/01/2016	Enucleación	04/05/2018	Hígado	alto	Si
MU13	M	79,00	CC	Mixto	11/02/2016	Enucleación	16/05/2017	Hígado	alto	Si
MU15	M	45,00	C		31/03/2016	Braquiterapia	10/12/2019	Hígado; bazo; Pulmón; ganglios	alto	No
MU16	H	64,00	CC	Epitelioide	03/05/2016	Enucleación	10/03/2020	Hígado	alto	No
MU26	M	90,00	C	Epitelioide	09/02/2017	Enucleación	12/11/2018	Pulmón	bajo	Si
MU43	M	58,00	C	Epitelioide	10/10/2017	Enucleación	03/06/2019	Hígado; tejido celular subcutáneo	alto	No
MU44	H	80,00	C		19/10/2017	Braquiterapia	21/12/2018	Pulmón; hígado; bazo; ganglios; hueso	alto	Si
MU47	H	76,00	CC	Epitelioide	04/01/2018	Enucleación	08/01/2019	Hígado	alto	Si
MU48	H	74,00	C	Mixto	13/02/2018	Enucleación	17/01/2020	Hígado	alto	Si
MU50	H	59,00	C	Epitelioide	13/03/2018	Enucleación	07/12/2020	Hígado	bajo	No
MU55	H	91,00	C	Epitelioide	05/07/2018	Enucleación	21/03/2019 + 24/02/2020	Hígado; tejido celular subcutáneo	alto	Si

Tabla 31: Descripción detallada, individualizada, de las características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas de los pacientes con metástasis. Id: identificación del paciente; **LOC**: localización intraocular del tumor; **ANAT**: anatomía patológica; **TRAT**: tratamiento; **Mx:** metástasis; **CROM:** cromosoma; **GEN**.: genético.

C2. 4.4 ESTUDIO EN DETALLE DE MU RECIDIVANTES

C2. 4.4.1 Recidiva post-terapia ionizante

El paciente MU9, de 65 años, fue diagnosticado inicialmente de un melanoma de coroides peripapilar situado en el cuadrante nasal superior, con dimensiones de 11,5 mm de diámetro basal y 3,75 mm de altura, que fue tratado con haz de protones.

A los 6 meses, mostró una nueva masa nodular en el polo posterior, extendiéndose hacia el cuadrante peripapilar inferior. El paciente fue sometido a enucleación y se estudiaron las alteraciones cromosómicas presentes en ambas masas tumorales (tumores primario y recidivante).

El MU primario tratado con haz de protones, mostró M3, pérdida de la región cromosómica 1p y ganancia de 8q. La masa recidivante, reveló M3, ganancia de 8q y 6p, y pérdida de 6q (Figura 21).

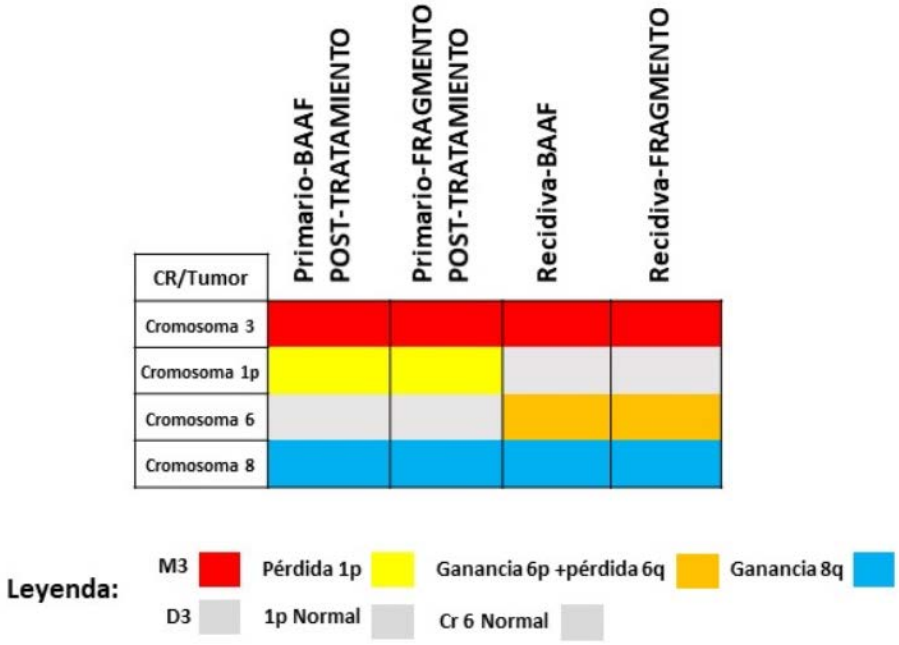


Figura 21: Resultado de MLPA obtenido para las muestras de la masa original y recidivante en el paciente MU9. Se muestra el resultado de las muestras tomadas mediante BAAF y fragmento tumoral tras enucleación para cada uno de los tumores (primario y recidivante).

C2. 4.4.2 Recidiva post-braquiterapia

El paciente MU56, de 64 años, fue diagnosticado inicialmente de una masa coroidea amelanótica con morfología nodular y abundante pigmento naranja en la porción posterior.

El resultado de la biopsia pronóstica pre-Braquiterapia reveló un descenso para marcadores del cromosoma 3. Once meses después, se detectó recidiva local del tumor y el paciente fue enucleado.

El resultado del MLPA de la masa primaria mostró, nuevamente, M3 en la muestra de fragmento tumoral tomado tras enucleación.

Respecto a la masa recidivante, no se detectó ninguna alteración cromosómica en la muestra tomada de fragmento tumoral tras enucleación, pero se detectó M3, ganancia de 8q y pérdida de 8p en la muestra tomada por BAAF (Figura 22).

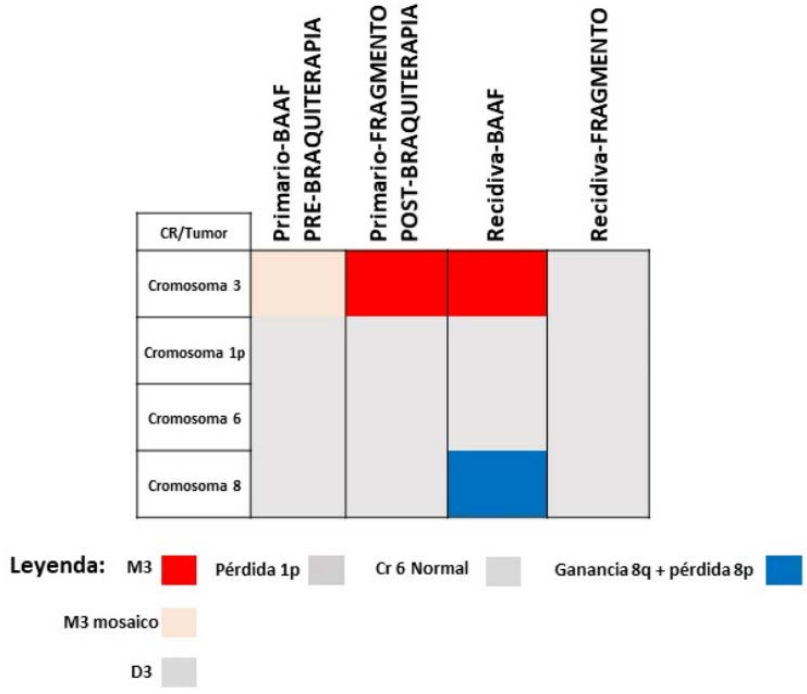


Figura 22: Resultado de MLPA obtenido para las muestras de la masa original y recidivante en el paciente MU56. Se muestra el resultado obtenido para muestras tomadas mediante BAAF y fragmento tumoral tras enucleación para ambas masas (tumor primario y recidivante).

C2. 4.5 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN CON EL RIESGO DE METÁSTASIS

C2. 4.5.1 Características clínicas e histopatológicas y riesgo de metástasis

Los MU de pacientes con metástasis mostraron mayor altura y diámetro basal que los de pacientes que no desarrollaron metástasis (p-valor = 0,027 y p-valor =0,030, respectivamente) (Tabla 32).

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para la edad del paciente (p-valor = 0,16), el sexo (p-valor = 0,20), la localización intraocular del tumor (p-valor = 0,22) o el tipo celular del mismo (p-valor = 0,56), entre pacientes con y sin metástasis (Tabla 32).

		Metástasis								
		No (n = 77)				Sí (n = 12)				
		Mediana	Rango	n	%	Mediana	Rango	n	%	p-valor
Edad		65	35-92			75	45-91			0,16
EcoBl (Base mm)		12,38	6,1-19,12			14,70	8,82-18,7			**0,030 ***
EcoAl (Altura mm)		6,08	1,3-14,6			8,38	3,17-15,05			**0,027 ***
Sexo	**Mujer**			41	53,3			4	33,3	0,20
	Hombre			36	46,7			8	66,7	
LOC	**Coroides**			65	84,4			8	66,7	0,22
	Cuerpo ciliar			12	15,6			4	33,3	
CEL	**Fusiforme**			3	9,7			0	0	0,56
	Mixto			7	22,6			3	9,7	
	Epitelioide			21	67,7			7	22,6	

Tabla 32: Asociación entre las características clínicas, demográficas e histopatológicas y el desarrollo de metástasis. **LOC:** localización intraocular; **CEL:** tipo celular

C2. 4.5.2 Alteraciones cromosómicas y riesgo de metástasis

Los pacientes con metástasis mostraron una mayor incidencia de M3 que los pacientes que no desarrollaron metástasis durante el transcurso de este estudio (p-valor = 0,002). Asimismo, en este grupo, se detectó una mayor presencia de pérdidas en 6q y 8p (p-valor = 0,028 y p-valor = 0,029, respectivamente).

Para el resto de alteraciones cromosómicas, pérdidas en 1p, ganancias en 6p y ganancias en 8q, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes (Tabla 33).

		Metástasis				
		No		Sí		p-valor
		n	%	n	%	
Pérdida Cr 1	**No**	34	52,3	8	66,7	0,36
	Sí	31	47,7	4	33,3	
Pérdida Cr 3	**No**	42	64,6	2	16,7	**0,002***
	Sí	23	35,4	10	83,3	
Ganancia Cr 6p	**No**	38	58,5	8	66,7	0,75
	Sí	27	41,5	4	33,3	
Pérdida Cr 6q	**No**	53	81,5	6	50,0	**0,028***
	Sí	12	18,5	6	50,0	
Ganancia Cr 8q	**No**	34	52,3	4	33,3	0,23
	Sí	31	47,7	8	66,7	
Pérdida Cr 8p	**No**	60	92,3	8	66,7	**0,029***
	Sí	5	7,7	4	33,3	

Tabla 33: Descripción detallada de la prevalencia de las distintas alteraciones cromosómicas estudiadas y su relación con el desarrollo de metástasis en la cohorte analizada.

C2. 4.6 ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA

C2. 4.6.1 Supervivencia asociada a alteraciones cromosómicas

Los pacientes con MU-M3 mostraron una menor probabilidad de supervivencia libre de metástasis que aquellos con MU-D3 (Log-rank, p-valor = 0,0028) (Figura 23A).

Asimismo, se detectó un descenso en el tiempo de supervivencia libre de metástasis en pacientes que mostraron tumores con ganancia en 8q frente a los que conservaron el número de copia normal para esta región. Un descenso que fue incluso más pronunciado en tumores que además mostraron M3 (Log-rank, p-valor = 0,02) (Figura 23B).

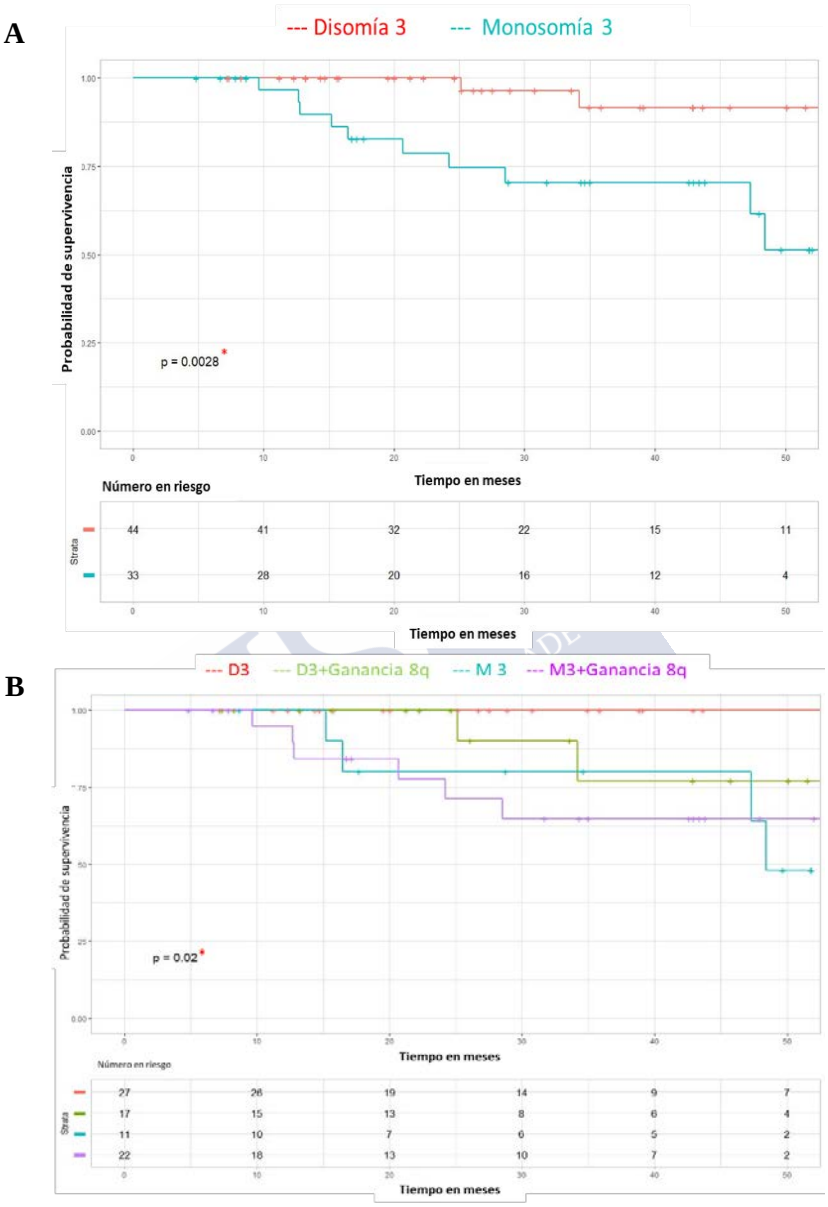


Figura 23: A) Curva Kaplan-Meier representando la supervivencia libre de metástasis de los pacientes con tumores D3 y los tumores M3 Log-rank, p-valor = 0,0028. **B)** Curva Kaplan-Meier representando la supervivencia libre de metástasis de los pacientes con tumores D3, D3+ganancia 8q, M3, M3+ganancia 8q. (Log-rank, p-valor = 0,02).

Respecto a la pérdida de 1p, los pacientes con tumores que además de M3 presentaban dicha pérdida, mostraron una menor supervivencia libre de metástasis (Log-rank, p-valor = 0,0083). Se observó un pronunciado descenso de la probabilidad de supervivencia del grupo D3+Pérdida 1p debido a que 1 de los 2 pacientes ubicados en el grupo MU-D3 que desarrollaron metástasis, presentaba dicha alteración. (Figura 24).

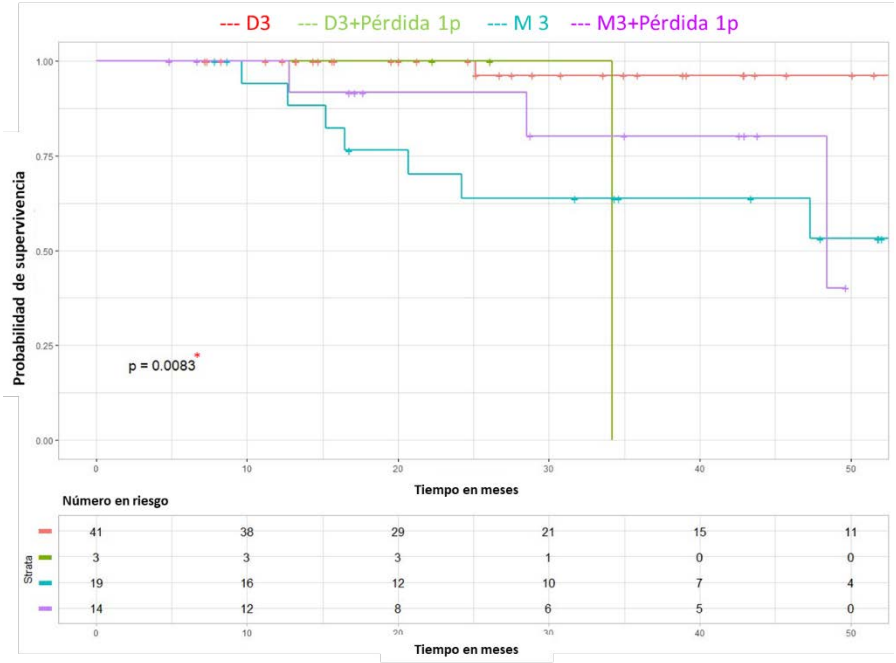


Figura 24: Curva Kaplan-Meier representando la supervivencia libre de metástasis de los pacientes con tumores D3, D3+pérdida 1p, M3, M3+1p. (Log-rank, p-valor = 0,0083).

En el grupo de pacientes con MU-D3, se vio una reducción de la supervivencia asociada a metástasis en pacientes con MU con pérdida de 6q frente a los que mostraron dosis normal para esta región cromosómica (Log-rank, p-valor = 0,00091) (Figura 25).

Finalmente, no se detectaron diferencias significativas entre la probabilidad de supervivencia libre de metástasis de pacientes con MU con y sin ganancias en 6p (Log-rank, p-valor = 0,83) (Figura 26).

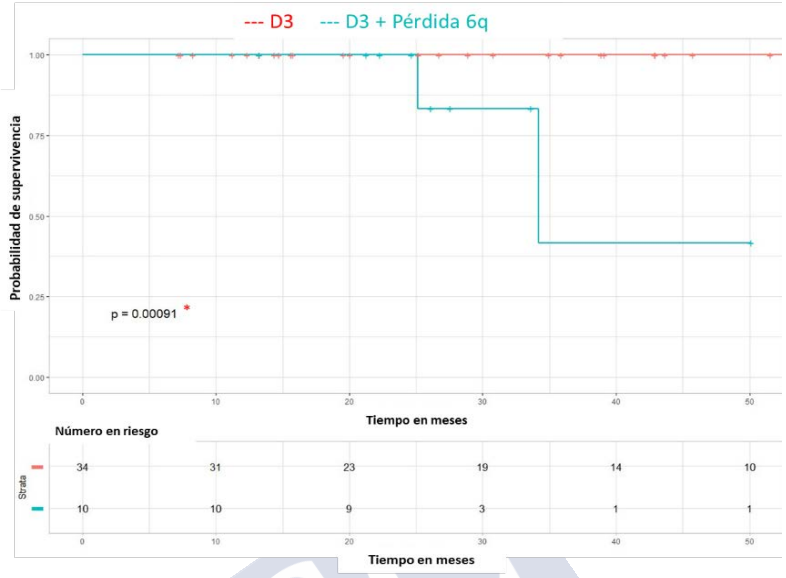


Figura 25: Curva Kaplan-Meier representando la supervivencia libre de metástasis de los pacientes con tumores D3, D3+pérdida 6q. (Log-rank, p-valor = 0,00091).

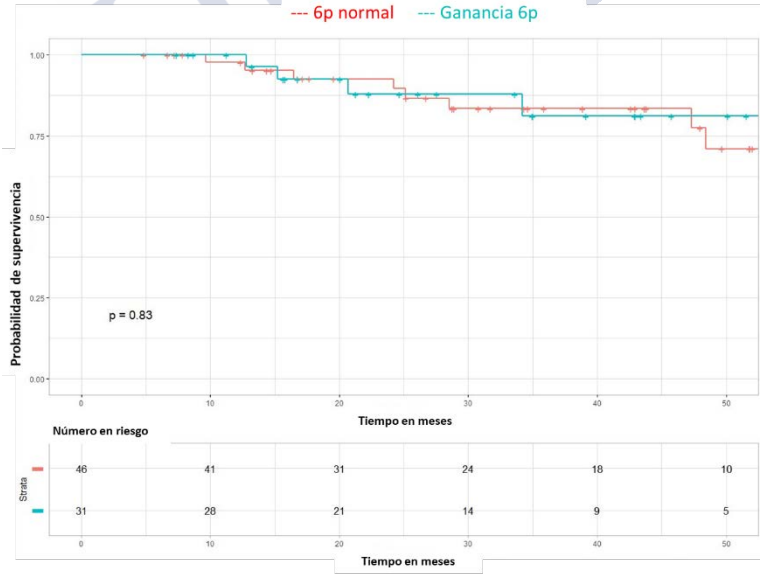


Figura 26: Curva Kaplan-Meier representando la supervivencia libre de metástasis de los pacientes con y sin ganancia de 6p. (Log-rank, p-valor = 0,83).

C2. 4.6.2. Supervivencia asociada a características clínicas e histopatológicas

La probabilidad de supervivencia libre de metástasis resultó similar para los hombres y las mujeres en la cohorte estudiada (Log-rank, p-valor = 0,25) (Figura 27).

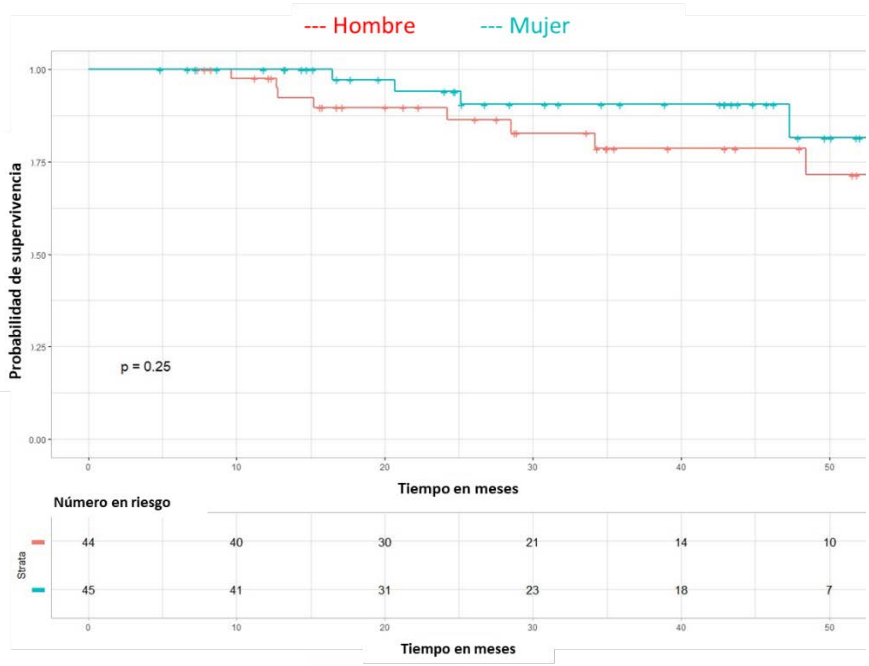


Figura 27: Curvas Kaplan-Meier representando las diferencias en la supervivencia libre de metástasis asociadas al sexo del paciente. (Log-rank; p-valor=0,25).

A pesar de que los pacientes afectados con MU con células epitelioides o mixtas mostraron una menor probabilidad de supervivencia libre de metástasis respecto a los que presentaron el tipo celular fusiforme, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Log-rank, p-valor = 0,59) (Figura 28A).

En cuanto a la localización intraocular del tumor, la supervivencia fue similar para pacientes con tumores coroideos frente a los que presentaron tumores con implicación del cuerpo ciliar (Log-rank, p-valor = 0,15) (Figura 28B).

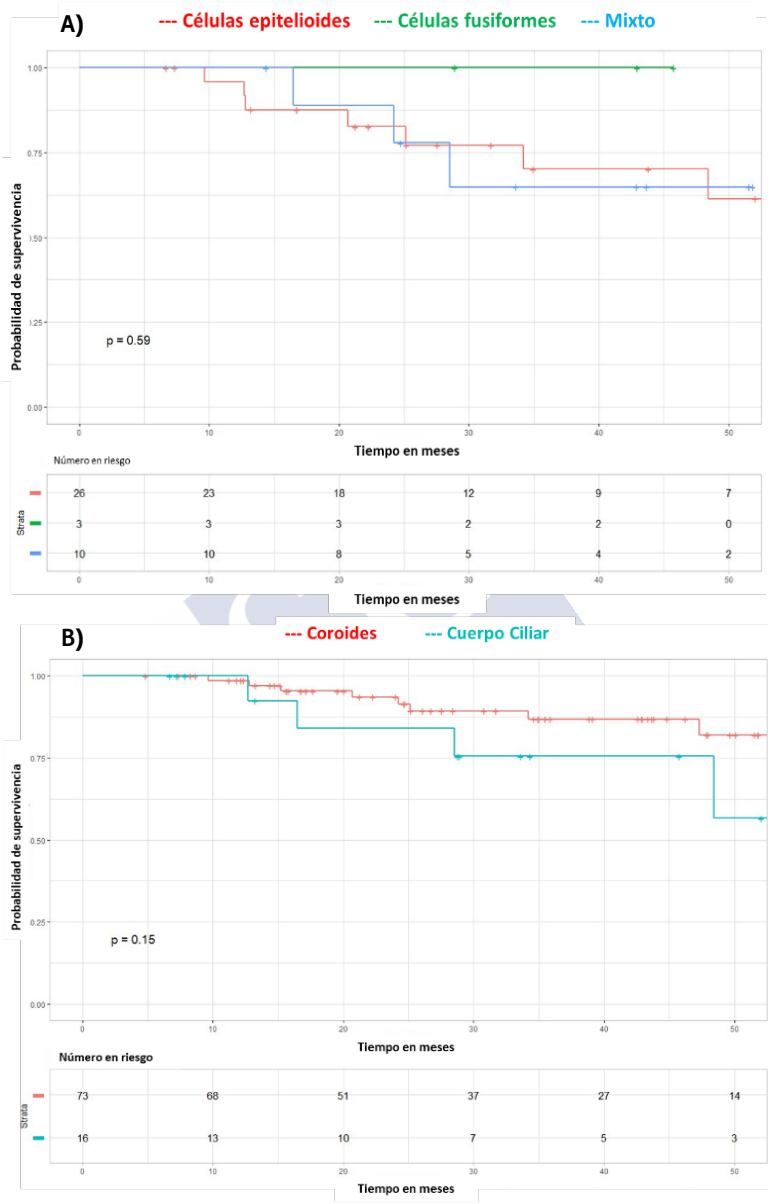


Figura 28: Curvas Kaplan-Meier representando las diferencias en la supervivencia libre de metástasis asociadas a: A) tipo celular del tumor, células epitelioides, células fusiformes o tumor mixto (Log-rank; p-valor=0,59); **B)** localización intraocular del tumor, coroides o cuerpo ciliar (Log-rank; p-valor=0,15).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C2. 5. DISCUSIÓN

En este capítulo, se evaluó el pronóstico asociado al perfil de alteraciones cromosómicas somáticas, en una cohorte de 89 pacientes diagnosticados y tratados de MU primario. El objetivo fundamental, consistió en la identificación precoz de los pacientes expuestos a un mayor riesgo de metástasis.

La técnica de MLPA fue seleccionada por ser sensible y de fácil ejecución, así como la más empleada en las principales unidades de oncología ocular europeas, y los resultados obtenidos fueron comparados con estudios pioneros en el campo[334,357,361,363,368,372-374]. Hasta donde llega nuestro conocimiento, el trabajo aquí presentado, constituye el único publicado, hasta la fecha, centrado en la detección de alteraciones cromosómicas en el MU y su implicación pronóstica en una cohorte española de pacientes.

Los resultados obtenidos mostraron una elevada correlación con la enfermedad metastásica. Específicamente, la M3, las ganancias en 8q y las pérdidas en 1p, 6q y 8p, se encontraron con mayor frecuencia en pacientes que acabaron desarrollando metástasis.

Los pacientes con alto riesgo de metástasis han sido y continúan siendo sometidos a rastreos sistémicos más exhaustivos y con mayor periodicidad. Pero, además, la estratificación de los pacientes en cuanto a riesgo de metástasis, ha aportado nuevos enfoques al grupo de investigación en Tumores Intraoculares del Adulto para la búsqueda de biomarcadores circulantes, facilitando el establecimiento de correlaciones entre los niveles de biomarcadores circulantes identificados en trabajos previos[137,141,142], y los grupos de riesgo descritos de acuerdo a los resultados genéticos.

C2. 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE

En la serie de pacientes aquí presentada, se incluyó el análisis de muestras de ADN tumoral procedente de 89 pacientes diagnosticados de MU primario entre el año 2015 y finales del 2020. El seguimiento medio de los pacientes fue de 34,54 meses (rango, 4,87-108,90), un intervalo de tiempo reducido en comparación a otras cohortes publicadas[144,334,357,368,375], por lo que los resultados aquí presentados podrían cambiar a medida que este aumentase.

La prevalencia de MU mostró un leve predominio, no significativo, en el sexo femenino, a diferencia de algunos trabajos[3,7,20], pero de acuerdo a otros llevados a cabo en población española[23,26].

Con respecto a la incidencia asociada a la edad de los pacientes, se observó que, tal y como se describió en la literatura, era mayor entre la 6ª y la 7ª décadas de vida. Siendo la edad media de los pacientes de 65,49 años, edad ligeramente superior a la media publicada de 55 años[3,15,20,23,93]. Pudimos comprobar que la incidencia del MU en población infantil y adolescente es muy reducida[14,51]. De hecho, el paciente que mostró menor edad en el momento del diagnóstico tenía 35 años.

Hasta un 80-90% de los melanomas diagnosticados en el tracto uveal afectan al coroides[18,88], a diferencia de los melanomas de iris con una prevalencia del 3-10%[37,47] y los de cuerpo ciliar (10% aproximadamente)[18,38]. En este trabajo, un 82% de los MU afectaban al coroides, un 18% al cuerpo ciliar y no se detectó ningún caso que de manera exclusiva implicase al iris. En un estudio de 8033 casos consecutivos de MU, Shields et al. describieron que hasta el 97% de los pacientes desarrollaban MU a nivel de coroides y cuerpo ciliar, mientras que tan sólo un 2% mostrarían afectación del iris[109]. Las diferencias que pueden darse en cuanto a las tasas de incidencia de MU según la localización en el tracto uveal entre los distintos trabajos, quizá podrían ser debidas al método seguido por los especialistas para determinar la localización intraocular del tumor cuando este compromete a varias regiones del tracto uveal.

C2. 5.2 PERFIL DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Del total de muestras estudiadas mediante MLPA, sólo para un 13,5% de ellas no se obtuvo un resultado concluyente. Para el 86,5% restante (n=77), el resultado fue exitoso. De esta última fracción, la mayor parte de las muestras mostraron entre 1 y 6 alteraciones cromosómicas (75,3%) mientras que en un 24,7% de los casos no se detectó ninguna alteración, no pudiendo descartar la existencia de una elevada heterogeneidad tumoral o clonal[340].

En nuestro estudio, la mayor parte de las muestras analizadas fueron tomadas por BAAF y no observamos una diferencia significativa respecto a las muestras tomadas de fragmento tumoral tras enucleación o endorresección del tumor en cuanto a rendimiento diagnóstico (p-valor = 0,123). Estos resultados, apoyan la validez del estudio de muestras tomadas por BAAF para el análisis molecular, permitiendo el estudio genético con valor pronóstico en pacientes donde se opta por tratamientos conservadores del globo ocular.

C2. 5.2.1 Monosomía 3

La M3 constituye la alteración cromosómica más importante en cuanto a la asociación con muerte por metástasis en los pacientes con MU[346], y su prevalencia oscila entre un 30-60%[376,377]. En la serie de pacientes aquí estudiada, un 42,8% presentaban pérdidas en el cromosoma 3. La prevalencia para esta alteración en nuestra cohorte, mostró ciertas discrepancias con estudios pioneros[334,357]. En concreto, Damato et al., la situaron en un 61,3%[334], tasa casi un 20% superior a la aquí reportada. Bajo nuestro punto de vista, estas diferencias podrían deberse al tamaño muestral valorado, a que alguno de los pacientes para los cuales no se obtuvo un resultado informativo tuviesen M3, o bien a la presencia de heterogeneidad tumoral que actuase enmascarando dicha alteración[338,340,368]. De hecho, pudimos comprobar que un 12,1% de los casos incluidos en el grupo de alto riesgo (MU-M3) mostraron mosaicismo tumoral para la M3 (ejemplo en el Anexo I).

En el MU, las pérdidas en el cromosoma 3 se manifiestan, generalmente, como la pérdida de una copia completa para el citado cromosoma. Sin embargo, en esta cohorte de pacientes, un 9% mostraron pérdidas parciales del mismo, implicando en todos los casos

a la región 3p. En la literatura, la incidencia de las pérdidas parciales en el cromosoma 3 varía entre el 0% y el 48%[145,350,354,357,363,366,378,379]. En nuestra cohorte, uno de los casos presentó pérdida exclusiva de los marcadores estudiados en la región 3p25.3 (*VHL-2* y *VHL-3*), y aunque se han descrito casos con pérdidas limitadas a esta región, en ninguno de los ellos se encontraba afectado el gen *VHL* (del inglés, Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor)[350].

C2. 5.2.2 Prevalencia de otras alteraciones cromosómicas y su asociación con la monosomía 3

Después de la M3, la segunda alteración más detectada fue la ganancia 8q (50,6%), identificada con mucha frecuencia en el MU[146,147,292,334,344,364,375]. Se ha descrito una mayor prevalencia en MU para dicha alteración en tumores con M3 y también que la combinación de ambas aneuploidías en un mismo tumor aporta una evolución nefasta de la enfermedad[292,334,347,361,362,375]. En la serie de pacientes aquí presentada, la mayor parte de los pacientes con ganancia en 8q presentaron, también, M3 (p-valor= 0,015).

Por otro lado, pudimos observar que un 11,7% de los MU mostraban pérdida para 8p y todos ellos en coexistencia con ganancia de 8q. Las ganancias en 8q, pueden manifestarse en forma de alteraciones numéricas y/o estructurales del cromosoma 8, como la trisomía 8, la aparición de isocromosomas 8q (i(8q)) o las ganancias exclusivas limitadas al oncogén *MYC*[288,358,364]. En este estudio, 3 casos mostraron ganancias compatibles con trisomía 8 (ganancia en 8q y ganancia en 8p), 9 pacientes mostraron alteraciones compatibles con la presencia de un i(8q) (ganancia en 8q y pérdida en 8p) y 5 presentaron ganancias limitadas a los marcadores situados en la región 8q24.1 (*ASAP1*, *MYC-1* y *MYC-3*). Aunque se ha demostrado que la cuantificación del número de copias de 8q incrementa notablemente la precisión en los modelos de predicción pronóstica[380], mediante el MLPA, al tratarse de una técnica semicuantitativa, no es posible diferenciar entre duplicaciones o amplificaciones (tres copias o más) de esta región.

Con respecto al cromosoma 6, en la bibliografía, se ha descrito un patrón excluyente para las ganancias en 6p y la M3[358,360,381]. Sin

embargo, un 10,4% de los MU aquí estudiados mostraron ambas alteraciones. En el año 2008, Ehlers et al. describieron que hasta un 4% de los MU mostraban coexistencia de M3 y ganancia en 6p[360]. El porcentaje aquí observado es superior, lo cual podría ser el reflejo de un éxito mayor a la hora de detectar distintas alteraciones cuando existe una potencial elevada heterogeneidad tumoral. No obstante, cabe resaltar que, de acuerdo a lo habitualmente descrito en otros trabajos[358,360,381], también detectamos una mayor prevalencia de ganancias en 6p en MU con disomía 3 (p-valor = 0,013). Por otro lado, 4 pacientes mostraron ganancia parcial para la región 6p implicando de manera exclusiva a los genes *ECI2* y *DCDC2*, sin embargo, hasta la fecha, no se ha publicado la existencia de un papel específico para estos genes en el MU.

Otra de las alteraciones recurrentemente descritas en el cromosoma 6, son las pérdidas en la región 6q. La prevalencia para esta alteración en nuestro estudio fue similar a la descrita por otros autores[288]. Las pérdidas en 6q se han asociado con MU metastásico, a menudo asociado a la M3. Sin embargo, al igual que Damato et al.[334], no detectamos una mayor prevalencia de esta alteración en tumores con M3, pero sí observamos la coexistencia de pérdida de 6q con la ganancia de 6p, en 12 pacientes. De forma similar a lo especulado en el caso del cromosoma 8, esta observación es compatible con un isocromosoma 6p i(6p), cuya presencia se ha asociado a la de otros isocromosomas y a la posible inestabilidad genética originada por la M3[292].

Finalmente, con respecto a la región cromosómica 1p, la mayor parte de los MU que presentaban esta alteración revelaron coexistencia con M3 (p-valor = 0,0002). Kilic et al., publicaron que el 89% de los tumores con M3 mostraban pérdida de 1p[355]. Una observación apoyada por otros autores que describieron una asociación de las pérdidas en esta región cromosómica con factores con valor pronóstico malo en el MU como la implicación del cuerpo ciliar, el tamaño del tumor o una tasa mitótica incrementada[334]. Características fuertemente asociadas, a su vez, con la M3[363]. Por otro lado, Damato et al. describieron una mayor prevalencia para de pérdidas en 1p en MU que implicaban al ojo derecho[334], pero en esta cohorte, no detectamos ninguna diferencia en cuanto a la lateralidad de los tumores y la pérdida de 1p.

C2. 5.3 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS EN LA ENFERMEDAD METASTÁSICA

Doce pacientes desarrollaron enfermedad metastásica a lo largo de este estudio, siendo la localización preferente de las lesiones metastásicas el hígado, al igual que se ha descrito en la literatura[100,359]. En contraposición a algunos estudios en los cuales se reportó un peor pronóstico en pacientes varones[22,107], pero al igual que lo descrito por el COMS[110], no detectamos diferencias en la supervivencia asociada al sexo. Respecto a la edad, Shields et al. describieron que los individuos jóvenes solían mostrar menor tamaño tumoral y por ello un menor riesgo de metástasis[109]. No obstante, tampoco detectamos diferencias en la supervivencia asociadas a la edad.

En cuanto a las características del tumor, la supervivencia de los pacientes fue similar de cuerdo a los distintos tipos histológicos de MU o a la localización intraocular del tumor. Pero, pudimos observar un tamaño significativamente mayor en los MU de pacientes con metástasis al igual que en estudios previos[110,111,113,114] (altura: p-valor = 0,027; base: p-valor = 0,031).

La mayor parte de trabajos similares publicados hasta la fecha coinciden en que la M3 se asocia con una reducción notable en la supervivencia libre de metástasis[144,145,334,341,346,347,349,352,357,363,382,383]. En nuestro caso, la alteración cromosómica que mostró un mayor valor pronóstico fue la M3, que además de una elevada prevalencia en pacientes con metástasis (p-valor = 0,002), se asoció a una menor supervivencia (Log-rank; p-valor = 0,0028). Alguno de los pacientes que mostró mosaicismo para M3 acabó desarrollando metástasis, sugiriendo que incluso una pequeña proporción de células tumorales con M3 desencadena la maquinaria molecular necesaria para la progresión nefasta de la enfermedad. A este respecto, Damato et al. ya habían descrito la necesidad de considerar informativos resultados limítrofes obtenidos en el MLPA[334].

Respecto a los casos de M3 parcial, revisando la literatura, hemos comprobado que existe cierta controversia en cuanto a su interpretación pronóstica. Mientras algunos autores la consideran un subgrupo clínico distinto[352,363,366], otros la incluyen en el mismo grupo de riesgo que la M3 completa[382]. Muy recientemente, Rodrigues et al. defendieron que

sólo las pérdidas parciales en el cromosoma 3 que conllevan la pérdida de una copia del gen *BAP1,* se asocian con mal pronóstico de la enfermedad[351]. Sin embargo, por el momento, los 2 pacientes que mostraron pérdida de la región 3p (y por tanto de una copia de *BAP1*), incluidos en el grupo de alto riesgo, se mantienen sin rastro de enfermedad metastásica. Lo mismo ocurre en el caso del paciente que mostró pérdida exclusiva para 3p25.3, ya que, aunque el gen *VHL* se encuentra alterado en una gran variedad de tumores, en el caso del MU no se ha reportado su asociación con un peor pronóstico de la enfermedad.

Por otro lado, a pesar de que la D3 se asocia con un pronóstico favorable del MU[346], en este trabajo 2 pacientes con MU-D3 desarrollaron metástasis. Pero, es necesario mencionar que ambos presentaron otras alteraciones citogenéticas y genéticas asociadas a un pronóstico desfavorable. Uno de los pacientes, (MU26), mostró pérdida de 1p, ganancia para 6p y 8q y pérdida para 6q y 8p. Aunque todas estas alteraciones se han asociado con la M3a excepción de las ganancias en 6p, las pérdidas en 1p, 6q y 8p, y especialmente las ganancias en 8q, parecen tener valor pronóstico independiente[292,313,343,347,355,365]. Con todo, es necesario recordar que en el MU se han descrito otro tipo de alteraciones, como la isodisomía 3, que afectan directamente al cromosoma 3 pero que no implican la pérdida de una de sus copias. A efectos funcionales, se ha sugerido que la isodisomía 3 equivale a la M3 en cuanto a pronóstico[353,354]. Y hay que valorar que una de las principales limitaciones que ofrece el MLPA, es la incapacidad para detectar dicha alteración, por lo que no puede descartarse, *a priori,* que estuviese presente en el MU de este paciente. En el caso del segundo paciente con D3 que desarrolló metástasis, pudimos comprobar, *a posteriori,* que mostraba una mutación en el gen *SF3B1,* que como veremos en el siguiente capítulo, se presenta mutado, por lo general, en MU con D3 y se asocia con un riesgo intermedio de metástasis de aparición tardía[148,151,384-387].

Como se ha mencionado, la M3 está relacionada con características clínicas e histopatológicas con valor pronóstico en el MU como la implicación del cuerpo ciliar[136,144,339,346,363], el tipo celular epitelioide[136,144,339,355,363], o un mayor tamaño tumoral[143,347]. En nuestro

estudio, únicamente detectamos una relación significativa para la altura tumoral (p-valor = 0,0031). Es preciso mencionar que, por ejemplo, en el caso del tipo celular, sólo se disponía de información en los MU procedentes de pacientes que fueron sometidos a enucleación, por lo que el resultado obtenido podría no ser representativo de la serie en estudio. Para otras características como la edad o el sexo, tampoco encontramos ninguna asociación con la M3, algo previsible de acuerdo a lo comúnmente descrito[144,339,355,363]. Aunque, en algunos estudios se ha sugerido que la M3 se asociaba con pacientes de edad avanzada[388].

Otro hallazgo relevante, fue que los pacientes con M3 y ganancia de 8q, mostraron una probabilidad de supervivencia menor que aquellos con alguna de estas alteraciones por separado (Log-rank; p-valor = 0,02). Sin embargo, en contraposición a otras cohortes de pacientes[143,334,347,357], no detectamos una prevalencia mayor de ganancias en 8q en pacientes metastásicos frente a no metastásicos. Resultado que podría estar sesgado por el escaso tiempo de seguimiento, ya que, es probable que otros pacientes con dicha alteración acaben desarrollando metástasis.

La probabilidad de supervivencia libre de metástasis, también resultó menor en pacientes con pérdida de 6q (Log-rank; p-valor = 0,00091), cuando ésta se evaluó en el grupo de pacientes con D3 para evitar el efecto pronóstico asociado a la M3. Por el contrario, no detectamos diferencias en las curvas de supervivencia de pacientes con y sin ganancias en 6p. En apoyo a nuestro resultado, en algunos trabajos, las ganancias en 6p fueron excluidas como predictores independientes de metástasis, pero se resaltó su utilidad para confirmar la presencia de tejido tumoral en la muestra a analizar[334].

Se ha propuesto que las pérdidas en 1p, aparecen en el MU de manera secundaria a la M3 y que se asocian con pronóstico más adverso[355,389]. En nuestro estudio, observamos una reducción en la supervivencia asociada a dicha alteración (Log-rank; p-valor = 0,0083). Tres de los pacientes con pérdida de 1p, mostraron dosis normal para el cromosoma 3. En algunos trabajos, se ha descrito esta misma observación[143,346,363] y se ha sugerido que realmente estos tumores podrían portar isodisomía 3[390], alteración aparentemente similar a la M3 a efectos de supervivencia en los pacientes[353,354]. Como se ha

mencionado, el MLPA no permite distinguir el origen parental de cada una de las copias de un cromosoma, sin embargo, de ser real la hipótesis postulada por dichos autores, estos 3 pacientes con D3, podrían portar, realmente, una pérdida de heterocigosidad adquirida del cromosoma 3 (isodisomía).

Con ligeras discrepancias, los resultados observados en nuestro estudio se encuentran en línea con los pioneros en el campo[334,352,357,375] y, por ello, apoyan la inclusión de esta técnica en la rutina de la unidad para la selección de pacientes de alto riesgo. No obstante, deben ser objeto de reevaluación y seguimiento constante y periódico, ya que otros pacientes podrían desarrollar metástasis, especialmente aquellos con alteraciones cromosómicas con valor pronóstico independiente como la M3 o las ganancias en el cromosoma 8q.

C2. 5.4 Pros, contras y perspectivas futuras de la biopsia pronóstica en el MU

Aproximadamente un 50% de los pacientes con MU, acaba desarrollando metástasis[93]. La enfermedad metastásica puede desarrollarse después de un largo intervalo de tiempo, lo cual ha sugerido la posibilidad de una siembra de micrometástasis ocultas, previas al tratamiento local del tumor, que se mantienen en estado de latencia durante largos periodos de tiempo[391].

A diferencia de otros tipos de cáncer, en el MU, el tratamiento continúa siendo meramente local y los pacientes que desarrollan enfermedad metastásica, todavía se ubican en un escenario fatal ante la ausencia de respuesta a los agentes quimioterapéuticos habituales y la falta de terapias específicas. No obstante, el creciente avance en el estudio de esta neoplasia maligna, ha permitido demostrar que el análisis del perfil citogenético y genómico de estos tumores constituye, a día de hoy, la herramienta pronóstica más sensible y específica en el MU.

Por el momento, los avances más significativos bajo la aplicación de la biopsia pronóstica en MU, se han traducido en la posibilidad de clasificar a los pacientes en grupos de riesgo de acuerdo a las alteraciones citogenéticas que presentan a nivel tumoral. En nuestro grupo, hemos conseguido diferenciar que al menos un 37,1% de los 89

pacientes estudiados pueden incluirse en un grupo de alto riesgo de metástasis. A día de hoy, estamos observando la existencia de una gran correlación entre el perfil citogenético de los MU y el desarrollo de enfermedad metastásica.

La biopsia pronóstica tiene sus propias limitaciones, algunas inherentes a la técnica y otras a la naturaleza del tumor. Un problema derivado de la aplicación de esta técnica, descrito en otras series de pacientes[336,341,352], consiste en la obtención de una muestra con escasa celularidad, generalmente asociada a un grosor limitado del tumor[337,375,392]. En este aspecto, el uso de técnicas sensibles y precisas como el MLPA, posibilita el estudio de pequeñas muestras tumorales[334]. En la serie de pacientes aquí presentada, la mayor parte de las muestras analizadas fueron obtenidas por BAAF. Una de las lecciones obtenidas de la experiencia en la aplicación de esta técnica, fue concentrar al máximo posible la cantidad de ADN tumoral extraída. Aun así, para un 13,4% de las muestras no se obtuvo un resultado fiable en el estudio de MLPA.

Hoy en día, la segunda técnica molecular más empleada a nivel mundial para evaluar el pronóstico del MU, es el GEP, que estudia la expresión de 15 genes con valor pronóstico en el MU[160,369]. Con esta metodología, se ha sugerido una reducción significativa de los resultados no informativos en tumores de pequeño tamaño[369,370]. Sin embargo, el GEP, ofrece también sus propias limitaciones, entre las cuales se encuentra la obligatoriedad de trabajar con ARMm, una molécula mucho más lábil y sensible a la degradación que el ADN. Por ello, ciertas unidades de oncología ocular recurren al análisis de alteraciones citogenéticas, especialmente de la M3. En nuestro caso, hemos podido comprobar y confirmar, que el estudio de la M3 no es suficiente y que la presencia de otras alteraciones cromosómicas con valor pronóstico debe ser evaluada en todos los casos. En este sentido, el MLPA, resulta una técnica altamente sensible, reproducible y de coste asumible por los distintos sistemas de salud[334,362]. Aunque, muy recientemente, se han descrito aproximaciones moleculares donde partiendo de cantidades muy reducidas de ADN tumoral, pueden estudiarse no sólo las alteraciones cromosómicas, sino también mutaciones puntuales en genes con valor pronóstico en MU[386,387].

Otro de los grandes desafíos al cual nos enfrentamos con la biopsia pronóstica, es la heterogeneidad tumoral. La existencia de poblaciones celulares distintas, puede dificultar la interpretación de los resultados, especialmente, en el estudio de las muestras tomadas por BAAF llevando, en ocasiones, a una predicción incorrecta del pronóstico del paciente[340,368]. No obstante, Coupland et al., demostraron que los resultados de MLPA de muestras tomadas mediante biopsia y los obtenidos en especímenes tumorales pareados tomados tras enucleación o endorresección del tumor, mostraban una concordancia del 100%[374]. Además, se ha propuesto que la combinación de distintas técnicas moleculares podría resultar idónea para confirmar la presencia de líneas celulares con alteraciones cromosómicas distintas[334]. Sin embargo, en un trabajo comparativo donde se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos mediante MLPA, FISH y array de SNPs, se concluyó que las tres técnicas eran comparables a la hora de predecir la supervivencia a 36 meses de los pacientes[393]. Así, aunque para algunos autores la heterogeneidad tumoral constituye un problema a la hora de clasificar correctamente a los pacientes[338,368], para otros, las biopsias tumorales resultan fiables[340,374].

En nuestra serie de pacientes, un claro ejemplo de heterogeneidad tumoral se refleja en los MU recidivantes presentados, donde se llevó a cabo BAAF (tanto de la masa primaria como del tumor recidivante) antes de la enucleación en ambos pacientes y, donde pudimos comprobar ciertas discrepancias en cuanto a los resultados obtenidos. En concreto, en el paciente MU9, la masa recidivante mostró M3, un posible i(6p) y ganancia de 8q. De las tres alteraciones, tanto la M3 como la ganancia de 8q estaban presentes en el tumor primario y, sin embargo, no se detectó la pérdida en 1p presente en el mismo y, en su defecto, fue detectado el posible i(6p). Estos resultados fueron publicados en una comunicación corta donde, inicialmente, sugerimos que los hallazgos obtenidos podrían ser explicados en base a la posible existencia de heterogeneidad tumoral que podría enmascarar algunas de las alteraciones cromosómicas[394]. No obstante, se ha descrito a la M3 como un evento citogenético temprano que puede incrementar la inestabilidad genómica y conducir a la formación de isocromosomas[292]. Por tanto, es posible que el i(6p) identificado en la recidiva no estuviese

presente en el tumor primario. Esta hipótesis no explicaría, en cambio, la ausencia de la pérdida de 1p en el tumor recidivante, hallazgo compatible con la existencia de clones celulares portadores de alteraciones cromosómicas distintas en el MU primario[338,353].

En el caso del paciente que sufrió recidiva tras ser tratado con braquiterapia I^{125}, pudimos ver que, en el tumor primario, tanto la muestra tomada por BAAF como el fragmento tumoral tomado tras enucleación, presentaban M3. Sin embargo, en el caso del tumor recidivante, el fragmento tomado tras enucleación, no reveló la presencia de ninguna alteración cromosómica. En este caso, parece más prudente considerar que el resultado fue debido a un error de muestreo, teniendo en cuenta que el tumor analizado era de tipo amelanótico y su delimitación pudo resultar más dificultosa a los patólogos. Cabe mencionar que el estudio de la muestra tomada por BAAF de la masa recidivante sí reveló la presencia de M3, mostrándonos, en este caso, que la aplicación de esta técnica quirúrgica puede resultar incluso más fiable en el análisis de algunos especímenes.

Con todo ello, la biopsia pronóstica en MU, ha alcanzado una gran precisión en los últimos años y se ha convertido en el enfoque estándar habitual en el asesoramiento de pacientes con MU en las principales unidades de oncología ocular[395]. Conviene no olvidar que, tanto a nivel clínico como a nivel de laboratorio, llevar a cabo estas biopsias constituye un desafío que exige una estrecha colaboración entre los grupos multidisciplinares, con el fin de optimizar el procedimiento y maximizar la información que puede ser aportada al paciente. Gracias a la combinación de diferentes técnicas quirúrgicas, se ha posibilitado la obtención de muestra tumoral sin tener que limitar los estudios de investigación a las procedentes de fragmentos tumorales tomados tras enucleación del globo ocular. Ello, ha permitido disponer de un mayor número y variedad de muestras a estudiar. Además, es necesario tener en cuenta que, aunque otro de los principales inconvenientes de la biopsia pronóstica radica en su elevada invasividad, las nuevas vías de investigación se apoyan y nutren de la información aportada por los estudios llevados a cabo sobre el tejido tumoral. No obstante, actualmente, existe un creciente interés por la detección de biomarcadores circulantes que puedan ser analizados de una manera

menos invasiva, como la biopsia líquida[141,396]. Una aproximación que, *a priori*, podría resultar muy útil teniendo en cuenta que en el MU la diseminación de las células tumorales se produce por vía hematógena[18]. Otro de los enfoques más actuales y prometedores son los análisis a nivel de célula única (del inglés, single-cell analysis), que ofrecen una visión sin precedentes de la heterogeneidad del MU primario, permitiendo la identificación de biomarcadores genuinos de células metastásicas en el tumor primario[397].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3: PRONÓSTICO DEL MELANOMA UVEAL ASOCIADO AL ESTUDIO DE MUTACIONES SOMÁTICAS Y ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C3. 1. INTRODUCCIÓN

C3. 1.1 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN EN ONCOLOGÍA; RESUMEN DEL ESCENARIO ACTUAL

La secuenciación de nueva generación aplicada al cáncer constituye un pilar fundamental para el estudio de múltiples aspectos relacionados con esta patología, de creciente incidencia en las poblaciones actuales. El panorama relacionado con este tipo de estudios es muy amplio y cada laboratorio clínico establece sus propias reglas y selecciona las tecnologías empleadas.

Una de las principales herramientas de implementación de estas técnicas en los laboratorios clínicos, consiste en evaluar el conjunto único y complejo de alteraciones genéticas que subyace a las distintas neoplasias malignas. Siendo el objetivo fundamental, mejorar el cuidado y tratamiento del paciente por medio de un diagnóstico más personalizado, el conocimiento de datos y características con valor pronóstico, así como el suministro de terapias personalizas que puedan tener una eficacia más ajustada al perfil molecular de cada tipo de tumor. Para ello, el rango de estrategias genómicas empleadas oscila desde el estudio de la secuenciación completa del genoma tumoral o el estudio de su transcriptoma en áreas más propias de la investigación, hasta el estudio de paneles de genes específicos aplicados al diagnóstico clínico.

En el campo de la investigación, resulta de vital importancia llevar a cabo estudios de secuenciación completa de exoma o genoma, ya que la información aportada por los mismos cimenta las bases teóricas y prácticas del conocimiento acerca de las características moleculares del cáncer que luego pueden ser aplicadas en la clínica. Un ejemplo claro, es el conocimiento del papel de mutaciones en genes como el gen *CALR* en las neoplasias mieloproliferativas, o *KRAS* o *BRAF* en la evolución clínica y pronóstico del cáncer colorrectal o de pulmón, que derivan de este tipo de estudios[398].

No obstante, como ya se ha mencionado, a nivel clínico, la herramienta de secuenciación masiva más aplicada en la oncología molecular, es el estudio de mutaciones en genes diana por medio de la secuenciación de paneles de genes específicamente diseñados para cada tipo de cáncer. El diseño de estos paneles y la tecnología de secuenciación empleada varía sustancialmente de unos laboratorios clínicos a otros. Así, el número de genes incorporados en los distintos paneles es una de las variables modificables; algunos incluyen de manera exclusiva los genes principales que aportan información crucial respecto a la clasificación molecular, pronóstico o terapias específicas de un tumor en concreto. Por el contrario, otros laboratorios, además de los genes principales, incluyen otros que todavía se encuentran en etapas de exploración preclínica. Sin embargo, de acuerdo a diferentes guías publicadas que hacen relación a la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva al cáncer, el protocolo a seguir sería estudiar de manera exclusiva los *hotspot* mutacionales conocidos para dianas terapéuticas o con valor pronóstico y en ciertos casos, el estudio completo del gen cuando se hayan descrito mutaciones a lo largo de toda su extensión[398]. Por ello, cuando se lleva a cabo el diseño de un panel de genes, es necesario valorar qué información se quiere conocer y a qué tipos de muestras se quiere aplicar. Por ejemplo, en ciertos tipos de cáncer se estudia de manera exclusiva el tumor primario, mientras que, en otros como las neoplasias de tipo hematológico, puede interesar llevar a cabo un seguimiento de la enfermedad mínima residual postratamiento.

Los paneles de genes, pueden ser diseñados para detectar variantes de nucleótido único pequeñas deleciones e inserciones, variaciones en el número de copias y en ocasiones, variaciones estructurales (reordenamientos cromosómicos o traslocaciones no balanceadas) o genes de fusión.

C3. 1.2 CARACTERÍSTICAS DEL PERFIL MUTACIONAL EN EL MELANOMA UVEAL

C3. 1.2.1 Diferencias respecto al melanoma maligno cutáneo

En la introducción general de esta tesis doctoral, se anticipó que entre el MU y el MMC existen numerosas diferencias a nivel de tumorogénesis, en el modo de expansión de la enfermedad metastásica, en el tipo de alteraciones genéticas y moleculares de cada tipo de tumor y en la respuesta frente a terapias.

Una de las diferencias fundamentales entre ambos tipos de tumores radica en que, en el MU la influencia de la radiación UV no está reflejada en el perfil mutacional tal y como se describió en el proyecto TCGA (del inglés, The Cancer Genome Atlas) para el MU, destinado a dilucidar las bases moleculares de este tumor mediante el empleo de diferentes plataformas genómicas[155], así como en trabajos previos[399]. En ambos estudios se confirmó que en el MU la exposición a la luz UV no supone, *a priori*, un factor de riesgo carcinogénico. Aunque, sí existe cierta evidencia de su implicación en la oncogénesis del MU de iris[63].

A nivel molecular y genético, una de las principales diferencias existentes entre ambos tipos de cáncer, es la baja carga mutacional detectada en el MU, en el cual la densidad mutacional somática media se sitúa en torno a 1,1 mutaciones por Mb, mientras que en el caso del MMC, ésta es cercana a 18 mutaciones por Mb[155]. Pero el MU presenta su propio perfil genético, donde además de las alteraciones cromosómicas con valor pronóstico, al menos nueve genes aparecen significativamente mutados a nivel tumoral. En el TCGA se detalla que estos genes son: *GNAQ, GNA11, SF3B1, EIF1AX, BAP1, CYSLTR2, SRFS2, MAPKAPK5* y *PLCB4*[155]. Genes que, por el contrario, no presentan una elevada tasa mutacional en el caso del MMC[399]**.** Otros genes con mutaciones características del MMC como *BRAF* o *NRAS*[400] entre otros, no parecen estar recurrentemente mutados en MU[401-403].

En definitiva, realizando una visión en conjunto de las alteraciones descritas en MU, se objetiva que este tipo de tumor presenta una menor inestabilidad y complejidad genética en relación a otros tipos de cáncer. Algunos autores sugieren que las diferencias en el espectro mutacional de ambos tumores de origen melanótico pueden ser explicadas, en parte, por el resultado de la localización exacta de los diferentes melanomas

y su entorno más directo[348]. Es decir, que cada localización tiene su propia combinación de agentes carcinógenos a los cuales el tejido puede estar expuesto. En el caso del MU, su baja complejidad genética, permite un estudio y cuantificación adecuada de las fracciones tumorales y parece proporcionar, según algunos autores[372], una ventaja frente a otros métodos de análisis como los basados en estudios de expresión génica.

C3. 1.2.2 Vías de señalización alteradas en el melanoma uveal

En la mayor parte de los MU, se mantienen alteradas una serie de rutas de señalización debido a mecanismos genéticos o epigenéticos subyacentes que llevan a la transformación maligna de los melanocitos y a la consecuente aparición de un MU. Generalmente, las vías de señalización de retinoblastoma (Rb) y p53 suelen estar funcionalmente inhibidas, a pesar de que estos genes no suelen mutar en MU[310,404-406]. La proteína Rb se encuentra inactivada debido a su hiperfosforilación constitutiva como resultado de la sobreexpresión de la ciclina D1 en aproximadamente un 65% de los MU[310,311]. Otro mecanismo de inactivación de Rb, se basa en la hipermetilación del promotor del gen *CDKN2A*, aunque con cierta controversia, ya que esta modificación epigenética tiene lugar en un porcentaje muy reducido de MU[310,311,406]. Respecto a la vía p53, el gen *TP53*, se muestra raramente mutado en el MU, sin embargo, su expresión se encuentra inhibida por sobreexpresión de *MDM2*, y se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad[405].

En el MU también se ha descrito la activación de las vías de señalización PI3K/AKT[407] o la MAPK/ERK[408] (Figura 29). La activación de la primera es fundamental para la supervivencia y crecimiento celular y está presente en aproximadamente el 50% de los MU, frecuentemente en presencia de la hiperactivación simultánea de la vía MAPK[409,410]. Ambas vías son necesarias para la génesis del MU y se ha visto que el supresor tumoral PTEN actúa como regulador negativo de la última. Sin embargo, en el MU, la proteína PTEN se encuentra completamente inactivada en la mayor parte de los tumores, actuando como posible supresor tumoral[411].

En el caso de la ruta MAPK/ERK, su activación constitutiva está presente en un 45-86% de los MU, lo cual ha sugerido la existencia de

mutaciones activadoras situadas *upstream*[402,412]. Pues, los oncogenes *KIT* y los miembros de la familia RAS, típicamente mutados en otros tipos de cáncer activando de manera constitucional esta ruta, aparecen muy raramente mutados en el MU[403,412-415] al igual que el gen *BRAF* y otros miembros de la familia RAF[401-403]. La activación constitutiva de la ruta MAPK, puso de manifiesto la necesidad de buscar mutaciones en otros genes que pudiesen desempeñar esa función, quedando patente que otros mecanismos moleculares estaban implicados en la patogénesis del MU[416]. De hecho, se vio que mutaciones en *GNAQ*[416,417] y *GNA11*[70] son las principales responsables de la activación constitutiva de esta vía de señalización en mucho más del 50% de los MU[418]. Con el tiempo, se demostró la implicación de otros genes conductores (del inglés, driver genes) con función oncogénica como *CYSLTR2*[419,420] y *PLCB4*[399], ambos implicados en la activación de la ruta MAPK/ERK en tumores en los cuales *GNAQ* y *GNA11* permanecían sin mutar. Estos cuatro genes, codifican para subunidades de proteínas G receptoras o para efectores *dowstream* de las mismas. De manera que, cuando se encuentran mutados, desencadenan la activación de las rutas de señalización asociadas a los receptores de proteínas G (de inglés, GPCR signaling pathways) como las vías MAPK/ERK y PI3K/AKT, desempeñando un papel primordial en el desarrollo temprano del MU.

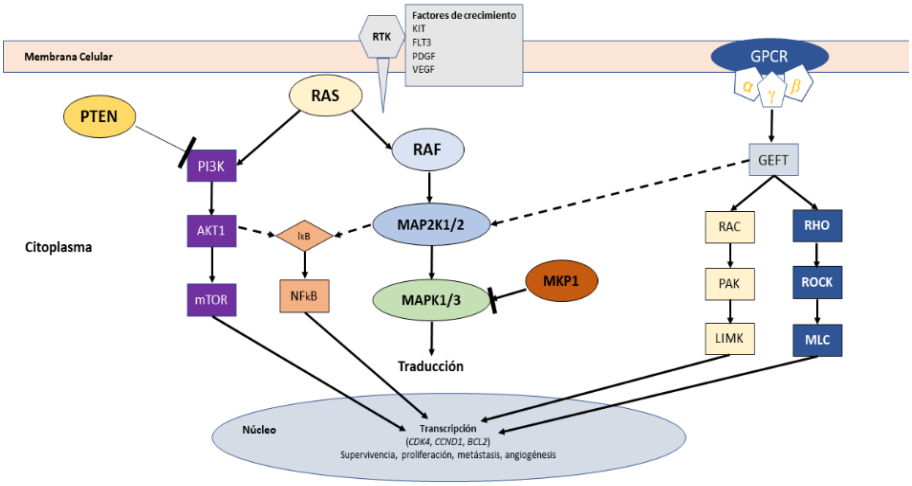


Figura 29: Representación esquemática de las principales rutas de señalización implicadas en el desarrollo del MU (Imagen adaptada de Romano et al. 2011)[421]. Los factores de crecimiento regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis de células a través de su interacción con los receptores RTK, que conduce a la activación de las rutas MAPK/ERK (MEK/ERK) y PI3K-AKT. Mutaciones en genes como *GNAQ* y *GNA11* conducen a una activación constitutiva de la ruta MAPK/ERK por medio de la interacción con los receptores GPCR.

C3. 1.3 GENES TÍPICAMENTE MUTADOS EN EL MELANOMA UVEAL

Los estudios de secuenciación masiva en el MU han permitido determinar la existencia de mutaciones somáticas en dos tipos fundamentales de genes *driver*; los *drivers oncogénicos* (*GNAQ*, *GNA11*, *CYSLTR2* y *PLCB4*) y las mutaciones en genes con implicaciones pronósticas (*BAP1*, *SF3B1*, *SRSF2* y *EIF1AX*) (Figura 30). Además, en raras ocasiones se han descrito mutaciones en otros genes como *FBXW7*[385], *MAPKAPK5*[155] o *TP53BP1*[422], aunque todavía con dudas acerca de su significado clínico en el MU (Tabla 34).

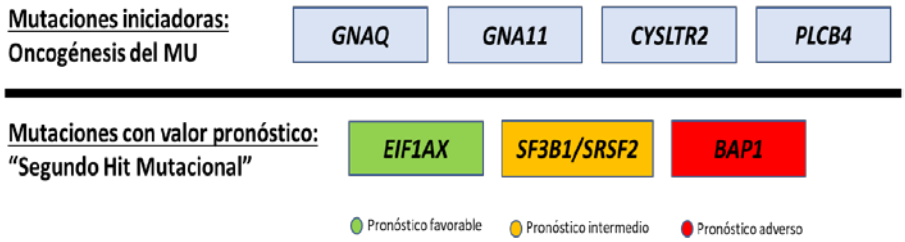


Figura 30: Esquema representativo de los genes significativamente mutados en MU implicados en el proceso de oncogénesis y en el pronóstico de la enfermedad (Imagen adaptada de Bakhoum et al. 2019[423]).

GEN	Porcentaje de muestras mutadas	Codones recurrentemente mutados
GNAQ	50%	**Q209P/L (90%)**
		R183Q (5%)
		G48*/V (5%)
GNA11	45%	**Q209L (94%)**
		R183C (3%)
		R166H (3%)
CYSTLR2	4%	**L129Q (100%)**
PCLB4	2,5%	**D630N/V/Y (100%)**
BAP1	33%	**Múltiples ***
SF3B1	23%	**R625H/C (78%)**
		K666T (11%)
		H662R (5%)
		T663P (5%)
EIF1AX	13%	G6D (20%)
		G8R (20%)
		G9R/D (20%)
		G15D (20%)
		W70R (10%)

Tabla 34: Resumen de los siete principales genes y sus mutaciones somáticas detectadas en el MU basado en el portal de información de genómica en cáncer cBioPOrtal[424] (http://www.cbioportal.org/), donde se incluyen los datos del TCGA[155] y otros estudios como el publicado por Johansson et al.2016[399].(Tabla adaptada de una presente en Bakhoum et al. 2019[423]).

C3. 1.3.1 Mutaciones iniciadoras

Las mutaciones en los genes *GNAQ*, *GNA11*, *PLCB4* y *CYSLTR2*, se consideran iniciadoras en el MU porque se encuentran presentes en casi todas las células tumorales. Otro de los motivos que hace determinante esta clasificación, es su demostrada presencia en los nevus coroideos, que en ocasiones constituyen el primer paso para el desarrollo de un MU, un factor especialmente atribuible a las mutaciones en los genes *GNAQ* y *GNA11*[425].

Una característica importante y común a las mutaciones activadoras es que, generalmente, son mutuamente excluyentes. Es decir, cuando un tumor muestra la presencia de una mutación iniciadora en uno de estos cuatro genes, no suele darse coexistencia con mutaciones en otro de ellos. Por otro lado, ninguna de las mutaciones recurrentes en estos genes se ha asociado con pronóstico en el MU. En ocasiones, los tumores pueden no presentar mutaciones en ninguno de estos cuatros genes, aunque este acontecimiento es muy raro en el MU[155].

C3. 1.3.1.1 Genes *GNAQ* Y *GNA11*

Los genes *GNAQ* (del inglés, G Protein Subunit Alpha Q) y *GNA11* (del inglés, G Protein Subunit Alpha 11), se localizan en los cromosomas 9q21.2 y 19p13.3, respectivamente. Se trata de genes parálogos, con una homología de secuencia próxima al 90% y cuya región codificante está compuesta por siete exones. Las proteínas codificadas por estos genes, muestran pesos moleculares similares (42142 y 42123 DA, respectivamente) y están constituidas por 359 aminoácidos. Ambos forman parte de una familia que codifica para las subunidades de unión a nucleótidos αq y α_{11} de las proteínas G heterotriméricas; GTPasas de unión a membrana cuya actividad se encuentra vinculada a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés, G protein-coupled receptors) (Figura 31)[426].

Cuando los receptores GPCR se unen a sus ligandos, sufren un cambio conformacional, se desacoplen las proteínas G y pasan a su estado activo. Como consecuencia, la función GTPasa de las proteínas G, vinculada a sus subunidades α, se activa y provoca a su vez la activación de las vías de señalización asociadas a proteínas G. De modo

que, la presencia de mutaciones que afectan a determinados residuos aminoacídicos de la subunidad α (glutamina o arginina), provocan un bloqueo en el estado activo de la proteína G, siendo una de las consecuencias directas el estímulo de la vía MAPK/ERK[70,417]. No obstante, la activación de esta vía es transitoria, y son necesarias otras alteraciones o mutaciones secundarias que mantengan estable la activación para el desarrollo de un MU. Ya que, en nevus o lesiones melanocíticas benignas también se han descrito mutaciones en estos genes, especialmente en *GNAQ*[124,427,417,428]. Estudios más recientes, han sugerido que la capacidad oncogénica de *GNAQ* y *GNA11* no radica en la activación de la vía MAPK, sino más bien en la vía YAP/Hippo[429], donde activan al complejo YAP/TAZ que interviene en el desarrollo de numerosos tipos de tumores[430,431].

Los primeros trabajos de secuenciación para *GNAQ* y *GNA11* en MU, demostraron que la presencia de mutaciones somáticas en ambos, seguía un patrón excluyente[70]. Asimismo, se detectó la existencia de *hotspot* mutacionales en los mismos, caracterizados por la presencia de variantes *missense* activadoras que afectan de manera exclusiva a los exones 4 y 5 de ambos genes y, específicamente a los residuos aminoacídicos p.R183 y p.R209[70,417,428] (Figura 31). En conjunto, estas mutaciones están presentes en aproximadamente un 80% de los MU, siendo los principales *driver* oncogénicos en el desarrollo temprano de este tumor[70,416]. En el residuo p.Q209, se han descrito al menos cinco tipos diferentes de mutaciones, y las variantes p.Q209P y p.Q209L son las más comunes. Las mutaciones que afectan al codón p.Q209, desencadenan una pérdida completa de la actividad GTPasa y como consecuencia, se genera una activación constitutiva permanente y prolongada en el tiempo de GNAQ y GNA11 y de su señalización *downstream.* Por el contrario, aquellas que afectan al residuo p.R183, generan una activación más tenue debido a una pérdida parcial de la actividad GTPasa[70,417].

Las mutaciones en *GNAQ y GNA11*, se encuentran en los nevus uveales y en la mayor parte de los MU, independientemente del estadio del tumor, dotación cromosómica u otras características con valor pronóstico. Por lo que, parecen ser necesarias, pero no suficientes, para la transformación maligna completa[417](Figura 31).

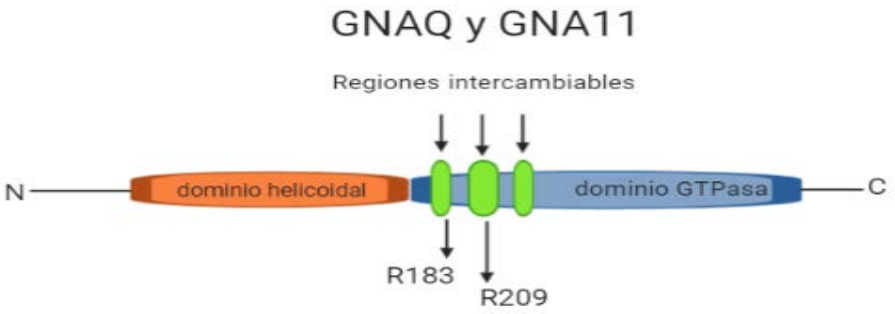


Figura 31: Representación esquemática de las proteínas codificadas por los genes parálogos *GNAQ* y *GNA11*. Se muestra la situación de los codones típicamente mutados en ambos genes en el MU (Imagen propia creada mediante BioRender[45]).

C3. 1.3.1.2 Gen *CYSLTR2*

El gen *CYSLTR2* (del inglés, Cysteinyl leukotriene receptor 2), localizado en el cromosoma 13q14.2, codifica para una proteína que actúa como receptor GPCR perteneciente a la familia proteica de tipo rodopsina (rhodopsin-like receptors), un grupo específico de receptores GPCR que responde a nucleótidos purinérgicos o piridiminérgicos. Se trata de un receptor de membrana que provoca la activación de las subunidades Gα y G_{11}. Por ello, puede ser considerado como un regulador *upstream* para el funcionamiento de la señalización mediada por *GNAQ* y *GNA11*[420] (Figura 29).

Este gen presenta un *hotspot* mutacional en el MU que supone la aparición recurrente de la mutación p.L129Q. En su lugar, algunos tumores muestran la mutación p.R136H, mucho menos frecuente[420]. Mediante estudios funcionales se demostró que sólo la mutación p.L129Q tenía efectos oncogénicos en MU. Se trata de un cambio de tipo *missense* que supone la sustitución de una leucina por una glutamina en el codón 129. Este residuo aminoacídico se sitúa en la hélice 3 del dominio transmembrana del receptor, que actúa asociándose a ligandos extracelulares, a la subunidad Gα y al resto de hélices transmembrana. En presencia de esta mutación, el receptor se encuentra activo de manera constitutiva. Se vio que esta mutación presentaba un efecto específico del linaje de los melanocitos y, mediante experimentos i*n vivo,* se comprobó que las células subcutáneas con melanina que expresaban la mutación p.L129Q, tenían

una mayor capacidad de generar tumores que aquellas que no portaban la mutación. Además, se observó únicamente en muestras de MU que no presentaban mutaciones en el resto de *drivers* oncogénicos[420].

C3. 1.3.1.3 Gen *PLCB4*

Otro gen significativamente mutado en el MU, es *PLCB4* (del inglés, Phospholipase C Beta 4). Se trata de un gen localizado en el cromosoma 20p12.3, que codifica para la enzima fosfolipasa C beta 4. La proteína PLCB4 cumple importantes funciones de transducción de señales extracelulares a nivel de retina. Además, es un importante efector *downstream* de las proteínas GNAQ y GNA11, activándolas por interacción directa y causando el funcionamiento de las mismas rutas de señalización[399,432].

El gen *PLCB4,* presenta un *hotspot* mutacional localizado en el codón p.D630 de la cadena proteica[399]. La primera mutación identificada en esta posición daba lugar al cambio de un residuo de ácido aspártico por una tirosina[399]. Se trata de una variante recurrente que fue considerada como perjudicial para el correcto funcionamiento de la proteína, pues afecta al dominio Y de la unidad catalítica de la enzima, una región altamente conservada entre especies y que juega un papel crucial en la transducción de señales de origen extracelular en la retina. Estas mutaciones conllevan una ganancia de función y actúan desencadenando la aparición de un MU[399]. Este mismo gen se encuentra ampliamente mutado en el MMC, donde las mutaciones se extienden a lo largo de toda su secuencia codificante, sin un claro *hotspot* mutacional[399,433]. Además, se han sugerido roles contrarios para este gen en ambos tipos de neoplasias; actuando como oncogén en MU y como supresor tumoral en MMC[399].

C3. 1.3.2 Mutaciones con valor pronóstico

Los estudios de secuenciación también permitieron determinar que la presencia de ciertas mutaciones somáticas muestra una elevada correlación con el pronóstico y la diferente evolución clínica del paciente. Actualmente, los principales genes con valor pronóstico en el MU son *BAP1*, *SF3B1* y *EIF1AX* (Figura 30).

C3. 1.3.2.1 Gen *BAP1*

La M3 fue, durante mucho tiempo, el mejor predictor de enfermedad metastásica en el MU, y puso de manifiesto que en este cromosoma debía haber genes con función de supresión tumoral.

Mediante estudios de mapeo cromosómico, varios grupos se centraron en tratar de descubrir cuál era la región crítica en el cromosoma 3. En el año 1999, Blasi et al. detectaron la presencia de una traslocación que involucraba a la región cromosómica 3p13 como única alteración identificada en un cultivo celular procedente de un MU primario; hecho que les sugirió que esta región podía albergar un gen supresor de tumores[434]. Posteriormente, se publicó que las regiones 3q24-26 y 3p25 se perdían frecuentemente cuando este cromosoma sufría pérdidas parciales[350,378,379].

Pero fue en el año 2010 cuando Harbour et al. publicaron un estudio en el cual el 47% de los MU presentaban mutaciones somáticas en hemicigosis para el gen *BAP1*, localizado en la región 3p21.1. Detectaron, además, que la mayor parte de los MU metastásicos (84% de los melanomas de clase 2 y sólo el 1% de los MU de clase 1) presentaban mutaciones en este gen[310]. Del mismo modo, se vio que la presencia de las mutaciones en *BAP1* mostraba una correlación muy elevada con el estado del cromosoma 3[155]. En el año 2016, van de Nes et al. publicaron que un 89% de los MU con M3, y ninguno de los que tenía D3, mostraban mutaciones en el citado gen[435]. Se vio también, que existía una relación entre la falta de expresión del gen *BAP1* y la ausencia de expresión de la proteína, lo cual se propuso como una característica clínica valorable de cara a evaluar el pronóstico de la enfermedad[435-439].

El gen *BAP1* está formado por 17 exones y codifica para la proteína-1 asociada a BRCA1. Una enzima que, como vimos, actúa regulando la actividad de otras proteínas con su actividad desubiquitinasa por medio de su dominio carboxiterminal ubiquitina. Los estudios *in vivo* con esta proteína demostraron que se encuentran implicada en el desarrollo del fenotipo melanocítico, y la ausencia de su expresión resulta en una diferenciación celular más primitiva, similar a un fenotipo propio de células madre[440]. Su ausencia de expresión conlleva cambios en los patrones de metilación del ADN[155,441].

Las mutaciones somáticas en *BAP1*, se producen de forma prácticamente exclusiva en tumores con M3 y se asocian de manera directa con el MU metastásico. Raramente ocurren en tumores de clase 1 o bajo riesgo de metástasis[149,385]. Respecto al tipo de mutaciones, se han descrito todo tipo de variantes patogénicas como deleciones, inserciones, cambios puntuales que dan lugar a codones prematuros de parada o sustituciones de un aminoácido por otro, variantes que llevan a cambios en la pauta de lectura, variantes que provocan cambios en el *splicing* e incluso variantes sinónimas con efecto patogénico. Se ha postulado que las mutaciones truncantes de tipo *frameshift* podrían llevar a la síntesis de ARN mensajeros defectuosos, sujetos a degradación mediante el mecanismo de degradación de ARN mediado por mutaciones terminadoras (del inglés, nonsense-mediated mRNA decay), la agregación de proteínas o la síntesis de proteínas truncadas con ausencia de las señales de localización nuclear situadas en el dominio c-terminal de la proteína. Mientras que las mutaciones de tipo *missense*, podrían llevar a la inactivación del dominio con actividad desubiquitinasa, aunque se mantendría la expresión y localización nuclear de la proteína[212]. Otros trabajos apuntan a que estas mutaciones provocan una desestabilización de la proteína[223].

C3. 1.3.2.2 Gen *SF3B1*

El gen *SF3B1* (del inglés, Splicing factor 3b subunit I), está formado por 25 exones y localizado en el cromosoma 2q33.1. Codifica para la subunidad 1 del complejo de proteínas del factor de empalme 3b, un componente del complejo proteico de riboproteínas nucleares pequeñas tipo U2 (snRNP) que participa en el *splicing* de los pre-ARNm y también forma parte del complejo espliceosoma menor U-12 dependiente[442] (Figura 32). Este gen cumple funciones esenciales en el proceso de *splicing* y algunas hipótesis apuntan que podría estar implicado en el cáncer por su capacidad para provocar un *splicing* alternativo de diferentes genes diana con funciones en procesos de tumorogenésis[148,442].

La proteína codificada por este gen, presenta en su extremo carboxi-terminal 22 repeticiones HEAT diferentes y en tándem formando estructuras helicoidales. En uno de estos dominios se

encuentra el codón típicamente alterado en el MU (p.R625) y se cree que la presencia de mutaciones en esta posición puede llevar a un cambio conformacional que afectaría al funcionamiento normal de la proteína, conllevando un probable *splicing* alternativo de muchos genes diana[442] (Figura 32).

La implicación de este gen en el pronóstico del MU fue conocida mediante un estudio de secuenciación de exoma completo[385], donde se detectó la presencia de mutaciones en tres tumores distintos de los cuales dos presentaban, en heterocigosis, la misma mutación que afectaba al codón p.Arg625, localizado en el exón 14 del gen[385]. En un estudio posterior, mutaciones afectando a este mismo codón fueron identificadas en MU de bajo grado y con buen pronóstico[443]. Harbour et al. describieron que todas las mutaciones encontradas en *SF3B1* en el MU, afectaban al residuo de arginina localizado en la posición 625 de la cadena proteica, que era sustituido por al menos cuatro aminoácidos distintos (p.R625H, p.R625C, p.R625G y p.R625L). Ninguno de los tumores presentaba pérdida para la región cromosómica 2q33.1, lo cual puso de manifiesto que dichas mutaciones actuaban, como dominantes-negativos, mutaciones de ganancia de función o como alteraciones que generaban haploinsuficiencia y que el gen no actuaba como supresor tumoral en el MU[443]. La tasa de mutación para este gen en el MU se sitúa entre el 11% y el 24%[385,422,443].

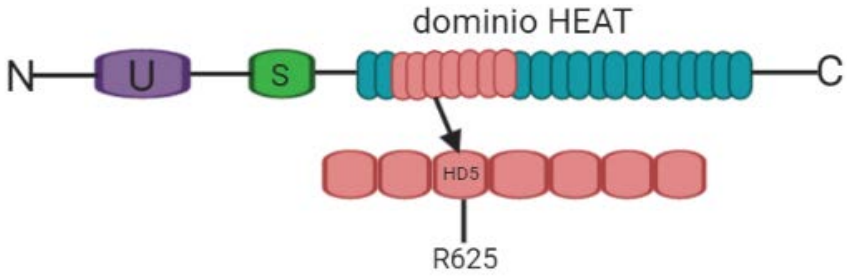


Figura 32: Esquema representativo de la estructura de la proteína codificada por el gen *SF3B1*, mostrando sus dominios proteicos; el motivo de interacción con U2AF2 (U), el motivo de interacción *SF3B1*(S) y 22 dominios HEAT diferentes (HD, del inglés HEAT Domain). El *hotspot* mutacional localizado en el MU en este gen se ubica en el HD5 y afecta al codón p.R625 (Imagen propia creada con BioRender.com[45] y adaptada de Golas et al.2003[442]).

Las mutaciones en *SF3B1*, se han asociado con características vinculadas a un pronóstico favorable de la enfermedad como la edad temprana del paciente en el momento del diagnóstico, la presencia de D3, la ausencia de mutaciones en el gen *BAP1* o la presencia escasa de células epiteliales en el tumor[148,443]. Inicialmente, los estudios de supervivencia en pacientes con MU con *SF3B1* mutado, no parecían mostrar relación alguna con el desarrollo de metástasis[365,385]. Sin embargo, posteriormente, se vio que a medida que el tiempo de seguimiento se iba incrementando, los pacientes mostraban un pronóstico significativamente peor y desarrollaban metástasis de manera tardía (hasta cinco años más tarde del diagnóstico), en comparación con los pacientes que tenían tumores con este gen sin mutar. Por lo que pudo concluirse que los tumores con D3 y *SF3B1* mutado, tienen un riesgo de metástasis mayor que aquellos que no presentan mutaciones en este gen[151].

Otra correlación importante hallada en relación a los MU con *SF3B1* mutado, es que estas mutaciones ocurren, frecuentemente, en tumores que expresan el oncogén *PRAME*, asociado a tumores de clase 1 con riesgo intermedio de metástasis[158 149,155].

C3. 1.3.2.3 Gen *EIF1AX*

El gen *EIF1AX* (del inglés, Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A, X-chromosomal), es de los genes mutados a nivel somático en MU más recientemente descubiertos, y se encuentra localizado en el cromosoma Xp22.12. Está formado por 7 exones y codifica para una proteína de 164 kDA implicada en la traducción proteica, facilitando el reclutamiento de la subunidad pequeña del ribosoma al extremo CAP 5’ de los ARNm. En el MU primario, se ha visto que este gen aparece mutado en el 8% al 21% de los casos y se ha asociado con una reducción en el riesgo de metástasis[148,152,385] (Figura 33).

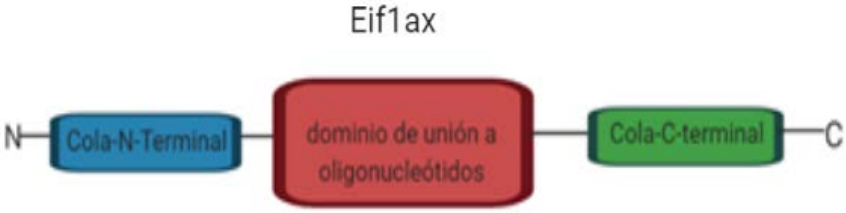


Figura 33: Representación esquemática de la proteína codificada por el gen *EIF1AX*, formada por tres dominios funcionales principales; el dominio N-terminal (N), el dominio de unión a oligonucleótidos (UO) y el extremo C-terminal (C) (Imagen propia creada con BioRender[45]).

Este gen no había sido previamente reconocido como diana mutacional en otro tipo de tumores, pero en el año 2013 Martin et al. detectaron en un estudio de secuenciación masiva la presencia de variantes de tipo *missense*, en heterocigosis o hemicigosis, en tres MU primarios. Además, vieron que se encontraba mutado en tumores con D3 y que no presentaban mutaciones en el gen *SF3B1*[152,385]. Estos mismos autores secuenciaron los 7 exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen en otras 66 muestras de MU primario, detectando mutaciones en 16 tumores. La mayor parte eran de tipo *missense* o pequeñas deleciones de uno o dos aminoácidos en el extremo N-terminal (del inglés, N-terminal tail; NTT) de la proteína, dejando su núcleo central con la superficie de unión al ARNm sin cambios[444] y alterando los 15 primeros codones de la cola N-terminal en aproximadamente el 15% de los MU[385].

En el MU, sólo se expresan los transcritos procedentes de ARNm mutado del gen *EIF1AX*, lo cual sugiere que las formas no mutadas de este gen se encuentran inactivadas epigenéticamente[161]. Se ha sugerido que las mutaciones en *EIF1AX* actúan alterando el punto de inicio de la traducción y la expresión de los productos proteicos derivados de ARNm procedentes de ciertos genes diana con interés en el proceso oncogénico, como genes supresores de tumores. Pero la naturaleza de sus efectores *downstream* todavía no ha sido dilucidada[385,445]. Se ha sugerido que, por lo general, los MU que presentan este gen mutado, tienen un excelente pronóstico, con un riesgo unas 10 veces menor de metástasis y no muestran mutaciones en *BAP1* ni M3[152,151,155,387].

C3. 1.3.3 Gen *LZTS1*

Como se mencionó en el capítulo 1 de esta tesis doctoral, el gen *LZTS1* (del inglés, Leucine Zipper Tumor Suppressor 1), localizado en el cromosoma 8p22, codifica para una proteína que actúa como supresor tumoral que se expresa de manera ubicua en todos los tejidos del cuerpo. Se cree que la proteína codificada por este gen podría estar implicada en la regulación del crecimiento celular. Asimismo, puede actuar como supresor tumoral, ya que participa en la estabilización del complejo CDC2-ciclina B1 y, por ello, contribuye a la regulación del ciclo celular y previene la proliferación celular incontrolada. Además, como vimos, estudios llevados a cabo por Onken et al. en el año 2008 demostraron que la expresión de este gen se encuentra silenciada en MU que metastatizan rápido y en células metastásicas, mientras que se expresa con normalidad en MU no metastásicos o en aquellos que metastatizan de manera tardía[313]. Por ello, fue definido como un supresor metastásico en MU. Ninguno de los estudios de secuenciación publicados hasta la fecha basados en el empleo de diferentes tecnologías, han incluido la secuenciación de este gen, por lo que el papel de las mutaciones puntuales en el pronóstico del MU ha sido escasamente estudiado.

C3. 1.3.4 Gen *BRAF*

El oncogén *BRAF* (del inglés, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), localizado en la región cromosómica 7q34, codifica para una quinasa que forma parte de la vía de señalización MAPK/ERK. Las mutaciones somáticas en este gen fueron descritas por primera vez en el año 2002 y se trata de las más prevalentes en el MMC[446]. Estas mutaciones constituyen un evento oncogénico inicial en la mayor parte de las lesiones melanocíticas, encontrándose en el 80% de los nevus melanocíticos benignos adquiridos, aunque mutaciones adicionales en otros genes son necesarias para la transformación maligna de los mismos[447]. En la mayor parte de los melanomas, las mutaciones más recurrentes son aquellas que implican al residuo aminoacídico p.V600, siendo la p.V600Glu la más común, encontrándose en el 40-60% de los MMC[448]. Sin embargo, en el MU, las mutaciones en el gen *BRAF* parecen estar ausentes[449]. Aunque, en un pequeño estudio publicado por

Henríquez et al. en el 2007, se vio que aproximadamente un 40% de los MU de iris mostraban mutaciones en este gen, por lo que este tipo de MU sí podría guardar una relación molecular con el MMC y, por el contrario, ser genética y clínicamente distintos a los MU con localización posterior[450].

C3. 1.4 PASOS DEL PROCESO DE CARCINOGÉNESIS EN EL MELANOMA UVEAL

En el proceso de carcinogénesis del MU, se ha descrito la intervención de diferentes mecanismos genéticos y epigenéticos. Como se ha visto en apartados previos, el MU es un tipo de cáncer que aflora en base a la malignización de melanocitos localizados en el tracto uveal. Los precursores de estos melanocitos, son los melanoblastos, que derivan de células procedentes de la cresta neural.

La activación de la señalización asociada a los receptores GPCR, es crucial para el desarrollo de un MU y ocurre, en la mayor parte de los MU primarios, por medio de las mutaciones iniciadoras en los genes *GNAQ, GNA11, CYSLTR2* o *PCLB4*, tal y como vimos en el apartado anterior [417,420].

Se ha propuesto que los nevus oculares podrían progresar hacia el desarrollo de un MU por medio de dos vías moleculares con distintas firmas genéticas y con un riesgo metastásico totalmente diferente. De manera que, aquellos MU en los cuales está presente la M3, mutaciones en el gen *BAP1* y en los cuales podría aparecer tardíamente pérdida de 1p, 8p y 6q, y/o ganancias en la región 8q, pueden llevar al desarrollo de la enfermedad metastásica (clase 2). Mientras que, los MU con D3 pero con otras alteraciones como ganancias en el cromosoma 6p o mutaciones en el gen *EIF1AX*, evolucionan con un riesgo bajo de metástasis (clase 1) (Figura 34). Asimismo, se han propuesto subgrupos de riesgo intermedio tanto en los MU de clase 2 como en los de clase 1.

En aquellos MU de clase 2 o alto riesgo que presentan ganancias en el brazo corto del cromosoma 6 (6p), el riesgo suele ser menor que en aquellos que no muestran esta alteración. Por otro lado, los melanomas ubicados en el grupo de clase 1 que presentan mutaciones en *SF3B1* y/o un incremento en la expresión del oncogén *PRAME*, muestran un riesgo tardío de metástasis[149,443] (Figura 34).

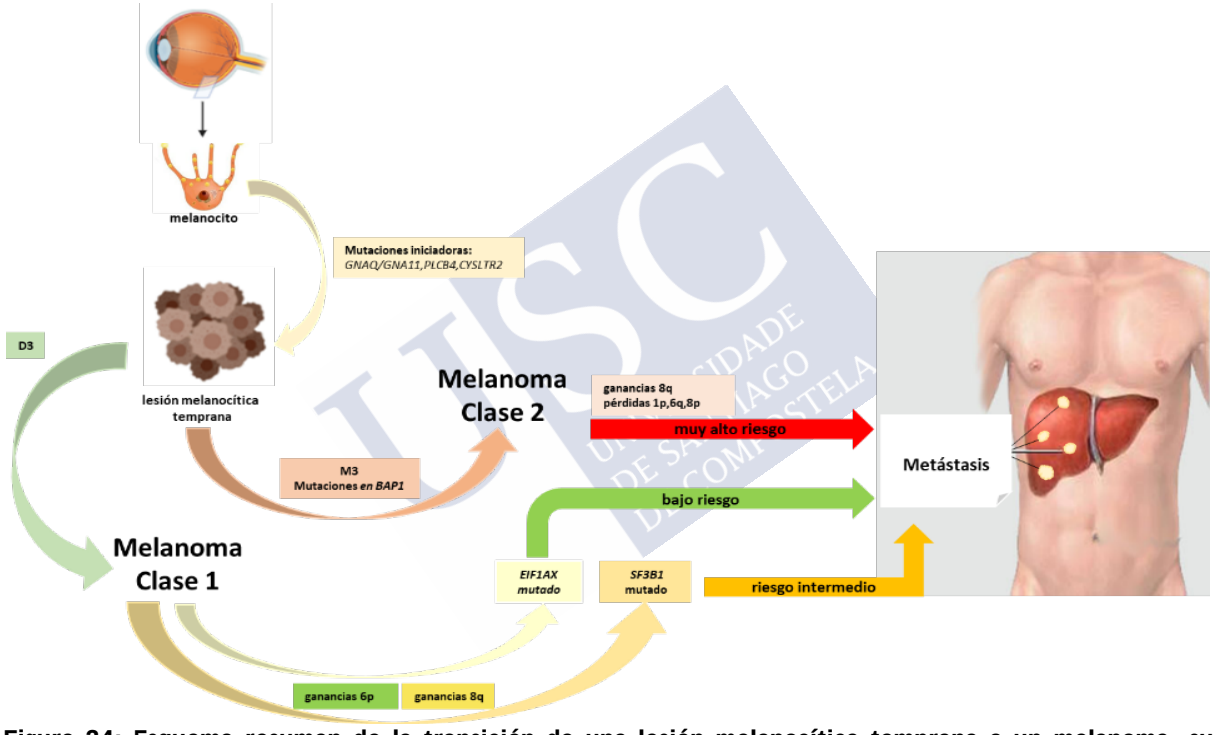


Figura 34: Esquema resumen de la transición de una lesión melanocítica temprana a un melanoma, su diferenciación en alto o bajo riesgo y las diferentes alteraciones cromosómicas y mutaciones que tienen lugar a lo largo del proceso y que en ocasiones llevan al avance fatal de la enfermedad (Adaptado de Amaro et al.2017 [100]) (Imagen propia creada con BioRender.com[45]).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C3. 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Frecuentemente, el desenlace de los pacientes con MU metastásico resulta fatal debido a la baja disponibilidad de terapias adyuvantes con eficacia probada. Así, es crucial no sólo reconocer a los pacientes de alto riesgo, sino también ser capaces de establecer un perfil molecular lo más amplio y específico posible de cada tumor que proporcione la oportunidad de elaborar las bases para una terapia y seguimiento individualizado y lo más personalizado posible en cada paciente.

Para alcanzar este objetivo fundamental, mediante este estudio se ha tratado de generar el perfil genético de cada tumor unificando la información obtenida del estudio de las alteraciones cromosómicas con carácter pronóstico y la procedente del perfil mutacional de los mismos para una serie de genes con especial interés a nivel oncogénico y pronóstico en el MU. Posteriormente, se procedió al análisis de la asociación de estas alteraciones genéticas con otras variantes clínicas con valor pronóstico y su relación con la progresión metastásica.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C3. 3. MATERIALES Y MÉTODOS

C3. 3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

C3. 3.1.1 Criterios de inclusión

- Diagnóstico de MU en la URQTIA del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (Santiago de Compostela).
- Consentimiento informado firmado por cada paciente incluido en el estudio.
- Muestra de ADN tumoral disponible en una cantidad suficiente para el estudio de secuenciaciación masiva en la FPGMX.
- Muestra de ADN tumoral procedente de MU primario obtenida antes del tratamiento (pre-braquiterapia), tomada de fragmento tumoral tras enucleación o por endorresección del tumor.
- Datos epidemiológicos y de seguimiento incluidos en el estudio completos para cada uno de los casos evaluados.

C3. 3.1.2 Criterios de exclusión

- Ausencia de consentimiento informado firmado por el paciente.
- ADN tumoral insuficiente o de escasa calidad para llevar a cabo el estudio de secuenciación masiva.
- Datos epidemiológicos y de seguimiento necesarios para llevar a cabo el estudio incompletos.

Los datos clínicos incluidos en el estudio fueron recogidos y aportados por los miembros de la URQTIA. Los datos clínico-patológicos obtenidos de cada paciente fueron la edad, sexo, fecha de diagnóstico, tratamiento recibido, fecha de tratamiento, fecha de diagnóstico de enfermedad metastásica, localización de las lesiones metastásicas y supervivencia.

Las muestras de ADN tumoral fueron tomadas del banco de la FPGMX del remanente disponible de cada muestra tumoral estudiada para biopsia pronóstica mediante técnica MLPA. De cada una de las

muestras, se evaluó la concentración y calidad (pureza e integridad del ADN, ausencia de melanina etc.) seleccionando aquellas que cumpliesen los parámetros necesarios para llevar a cabo los ensayos de secuenciación masiva.

C3. 3.2 MUESTRAS TUMORALES DE MELANOMA UVEAL

Se incluyeron en el estudio muestras de ADN tumoral de 46 pacientes diagnosticados y tratados de MU entre los años 2015-2018 en la URQTIA del CHUS. El diagnóstico clínico de estos pacientes se hizo sobre la base de un examen oftalmológico completo y ecografía ocular estandarizada. Las muestras de MU se obtuvieron principalmente antes del tratamiento del tumor mediante biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) (n=19), endorresección del tumor (n=5) o enucleación (n=22). Todas las pruebas genéticas se realizaron en la FPGMX en Santiago de Compostela. Se registró la información clínica epidemiológica y patológica de referencia de los pacientes incluidos.

Se obtuvo consentimiento informado escrito de todos los individuos incluidos en el estudio, tras su previa aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC) (Código de Registro: 2009/128) (IV, V y VI).

C3. 3.3 MUESTRAS DE ADN TUMORAL EMPLEADAS

En este estudio, se utilizaron muestras de ADN tumoral que habían sido previamente extraídas, purificadas y empleadas para el estudio de biopsia pronóstica mediante MLPA cuyos resultados fueron incluidos en el capítulo 2 de esta tesis doctoral. Se seleccionaron 46 muestras de ADN que se encontraban almacenadas en el banco de la FPGMX, congeladas a -20°C. Dado que la secuenciación mediante tecnología Ampliseq permite una concentración de partida de 1ng hasta 100ng, se seleccionaron muestras con una concentración mínima de 1ng/µL. De modo que, 3 de ellas no habían podido ser estudiadas mediante la técnica MLPA para la cual, como se vio en el capítulo anterior, se requiere un mínimo de 100ng totales (en 5 µL de volumen final) de ADN como muestra de partida para el ensayo.

Las concentraciones de ADN fueron evaluadas mediante fluorimetría, utilizando para ello el sistema QubitTM con el kit de ensayo Qubit dsDNA BR (de amplio rango) (ThermoFisher Scientific,

Grand Island, NY, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y para lo cual sólo fue requerida la cantidad de 1µL por muestra. Una vez medidas, se normalizaron las concentraciones de las muestras a 20ng/µL, haciendo diluciones en varias de ellas o incrementando los ciclos de PCR en la preparación de las librerías en aquellas que presentaban una concentración inferior a 20ng/µL.

C3. 3.4 ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS

Las muestras utilizadas en el estudio de secuenciación masiva para detección de mutaciones somáticas en el MU, fueron previamente clasificadas, en su mayoría, en los grupos de alto y bajo riesgo de metástasis de acuerdo con los resultados obtenidos por MLPA, por lo que se recurrió a la recolección de los resultados obtenidos para las 46 muestras incluidas en este estudio.

C3. 3.5 PANEL DE GENES AMPLISEQ-MELANOMA UVEAL

C3. 3.5.1 Características técnicas

Se diseñó una estrategia de secuenciación masiva dirigida al estudio de los principales genes con relevancia clínica en MU (*GNAQ, GNA11, PLCB4, BAP1, SF3B1 y EIF1AX*). Asimismo, en el diseño del panel de genes, se incluyeron otros como *BRAF* y *LZTS1*.

Para el diseño del panel se utilizó la herramienta gratuita Ion AmpliseqTM Designer 2.0 (ThermoFisher, Waltham, MA, EE.UU.). Los detalles del diseño se resumen en la tabla 35. De acuerdo con la bibliografía, los amplicones diseñados para los genes *GNAQ*, *GNA11*, *SF3B1* y *BRAF* sólo cubrían los exones que contenían los *hotspot* mutacionales conocidos. Los genes restantes (*PLCB4*, *BAP1*, *EIF1AX* y *LZTS1*) estaban completamente cubiertos en todos sus exones y regiones intrónicas adyacentes (±10 pb).

Parámetro	Especificación
Nº de genes incluidos	8
Objetivos	• Cobertura de los exones donde hay *hotspot* mutacionales (*GNAQ, GNA11, BRAF, SF3B1*) • Cobertura completa de la región codificante (*BAP1*, *EIF1AX, PLCB4* y *LZTS1*) y regiones intrónicas flanqueantes (±10pb)
Variantes detectadas	germinales y somáticas
Tamaño de amplicón (pb)	125-175 pb
Nº de amplicones	149
Cantidad ADN (ng)	5-20 ng
Muestras compatibles	tejido tumoral fresco, FFPE, y sangre
Cobertura regiones diana (%)	96,49%

Tabla 35: Panel de genes Ampliseq-Melanoma Uveal. Resumen de las características técnicas del panel de genes.

La preparación de la biblioteca fue ejecutada usando el kit de biblioteca Ampliseq 2.0. Finalmente, la secuenciación de amplicones de las librerías, fue realizada por los miembros de la plataforma de secuenciación masiva de la FPGMX mediante la plataforma Ion Torrent (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) y de acuerdo con el protocolo del fabricante.

C3. 3.5.2 Anotación y análisis técnico de las variantes

Después del proceso de secuenciación, los bioinformáticos de la FPGMX llevaron a cabo la anotación de las variantes mediante las herramientas bioinformáticas: TMAP 5.10.10, TVC 5.10-10, GATK v3.8-0, GATK v4.0.10.1, Picard 2.18.14-SNAPSHOT, BEDTools v2.27.1, SAMtools 1.9 y ExomeDepth 1.1.10. El porcentaje de lectura a una cobertura mínima 30x calculada sobre los genes diana, exones y regiones intrónicas flanqueantes hasta ±10 pb fue del 92%, con una profundidad de lectura media de 7480x. Se consideró una frecuencia alélica de variante (del inglés, Variant Allele Frequency; VAF) de un

mínimo del 5% para poder detectar la presencia de mosaicismo somático. Se excluyeron del análisis las variantes intrónicas (a excepción de las variantes de *splicing* flanqueantes al exón ±5 pb), las variantes sinónimas sin efecto sobre la proteína, así como las identificadas como polimorfismos comunes (MAF>1%) en las bases de datos de 1000 genomas y GnomAD. Finalmente, aquellas variantes no conocidas presentes en más del 90% de las muestras examinadas, fueron eliminadas al ser consideradas posibles artefactos de la técnica.

Mediante el estudio de este panel de genes, no fue posible la identificación de alteraciones genéticas como traslocaciones, reordenamientos cromosómicos equilibrados o variaciones en el número de copias. Del mismo modo, tampoco pudo excluirse en este ensayo la presencia de variantes en regiones no codificantes del ADN, pseudogenes, ni tampoco alteraciones epigenéticas. Es posible que, dado que existen regiones en el genoma que por sus propias características físicas y químicas dificultan su amplificación, existe la posibilidad de que la presencia en una muy baja proporción de una variante concreta en una de estas regiones no pudiese ser identificada, limitando la fiabilidad del resultado de secuenciación para dichas regiones. Esta característica es común para otros diseños y estudios de secuenciación en el genoma, por lo que ha de ser considerada como una limitación implícita de la técnica. No obstante, no se consideró como real ninguna variante por debajo de las 100 lecturas, por lo que es posible que en las muestras analizadas existiesen variantes reales que no se hayan considerado por encontrarse por debajo del umbral de detección establecido para la técnica.

Las mutaciones detectadas se visualizaron en el software IGV (Broad Institute, Cambridge, MA, EE.UU) y se compararon con la versión hg19 del genoma de referencia humano.

C3. 3.5.3 Estrategia de filtrado de las variantes

En primer lugar, la estrategia de filtrado seguida para los resultados de secuenciación obtenidos se basó en la detección de variantes patogénicas en las regiones *hotspot* conocidas para los genes en estudio, así como en la detección de variantes patogénicas ya descritas en bases de datos como COSMIC[155]. Además, respecto a las variantes no

descritas o con frecuencias muy reducidas en las principales bases de datos poblacionales (GnomAD_exomes_NFE≤0,01), se consideraron como patogénicas o probablemente patogénicas, variantes con efecto nulo como las que provocan la aparición de un codón de parada prematuro (*stopgain* o las deleciones e inserciones *frameshift*) y variantes en posiciones canónicas de *splicing* (± 2 pb). En el caso de las variantes *missense* no descritas, fueron consideradas patogénicas cuando al menos 5 predictores *in silico* de patogenicidad indicaban un efecto deletéreo de la variante. De este modo, se consideraron las siguientes herramientas y valores; CADD>20, dann>0.995, SIFT<0.05, Polyphen-2 >0.5, REVEL>0.45.

C3. 3.6 SECUENCIACIÓN SANGER DEL *HOTSPOT* MUTACIONAL EN EL GEN *CYSLTR2*

El exón 1 del gen *CYSLTR2* fue secuenciado por secuenciación capilar Sanger en las 46 muestras tumorales. Los cebadores empleados fueron diseñados de manera específica para detectar el *hotspot* mutacional de este gen. Específicamente, diseñamos cebadores para la detección de la mutación oncogénica p.Leu129Gln (NM_020377.2:c.386T>A).

Para el diseño de los oligonucleótidos se emplearon las herramientas gratuitas y disponibles online Primer3 Plus (2) (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) y la herramienta NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/). Se descartó la amplificación de posibles secuencias homólogas inespecíficas mediante el estudio con BLAST de los cebadores diseñados (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). La secuencia para los cebadores fueron 5'-GAGTCTTGGGAAATGGGTTG-3' para el *forward* y 5'-GAGTGTGAAAAATGGCAGCA-3' para el *reverse*. El producto derivado de la amplificación mostró un tamaño de 497 pb.

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de reacción de 25µL por muestra, incluyendo: 2µL de ADN tumoral, 5µL de Buffer 5x (con composición comercial), 1,5µL de 25mM MgCl2, 4µL de dNTP (5mM cada uno), 1µL de cada cebador (a una concentración de 10µM cada uno), 10,5µL de agua miliQ y 0,25µL de GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems,

ThermoFisher Scientific) siguiendo el siguiente programa de termociclado; desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos, 8 ciclos de amplificación a 94°C 30 segundos, una rampa de temperatura de 60°C a 55°C durante 30 segundos y 72°C 30 segundos seguidos de 22 ciclos a 94°C 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C 30 segundos y una extensión final durante 7 minutos a 72°C.

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (Invitrogen™ E-Gel™ 96 Agarose Gels, 2%) para comprobar la existencia de producto de PCR. El tamaño del fragmento amplificado se verificó mediante el sistema de electroforesis de alta sensibilidad Agilent 2100 Bioanalyzer system, siguiendo las instrucciones y protocolos del fabricante.

Finalmente, los fragmentos de PCR fueron secuenciados utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing y posterior electroforesis capilar ABI PRISM 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias fueron analizadas utilizando el software de alineamiento de secuencias Staden Package 2.0.

C3. 3.7 NOMENCLATURA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS

La nomenclatura de las distintas variantes genéticas identificadas sigue el sistema oficial de nomenclatura de la HGVS. Las secuencias de referencia de los genes analizados tomadas fueron las siguientes: *GNAQ:* NM_002072.5; *GNA11:* NM_002067.5; *PLCB4:* NM_000933.4; *BAP1:* NM_004656.3; *SF3B1*: NM_012433.4; *EIF1AX*: NM_001412.4, *BRAF*: NM_004333.6, *LZTS1*: NM_021020.5.

C3. 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba Chi-cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher. Las variables continuas o no paramétricas que no siguieran una distribución normal, se compararon entre dos grupos usando el test U de Mann-Whitney.

El estudio de la supervivencia del tiempo hasta la metástasis y la muerte relacionada con la metástasis se analizó mediante el método de curvas de supervivencia Kaplan-Meier (prueba de rango logarítmico; Log-rank). Asimismo, se estudió la posible asociación de las mutaciones y alteraciones estudiadas respecto al riesgo de desarrollo de

metástasis, para lo cual se valoraron los resultados correspondientes a las curvas de supervivencia (en meses) para las distintas variables genéticas.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando la p-valor fue menor a 0,05. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) así como herramientas estadísticas de Excel y el software gratuito R con diferentes paquetes estadísticos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

C3. 4. RESULTADOS

Los resultados aquí presentados fueron publicados en el artículo original **"Role of somatic mutations and chromosomal aberrations in the prognosis of uveal melanoma in a Spanish cohort of patients" (Acta Ophthalmologica, 2021, doi: 10.1111/aos.14760**[451]) (Ver información completa en Anexo VII).

Autores: Paula Silva-Rodríguez[1,2], Manuel Bande[2,3], Daniel Fernández-Díaz[3], Nerea Lago-Baameiro[4], María Pardo[2,4], María José Blanco-Teijeiro[2,3], Fernando Domínguez[1], Lourdes Loidi[1], Antonio Piñeiro[2,3]

Filiaciones:

[1]Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

[2]Tumores Intraoculares en el Adulto, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, España.

[3]Department of Ophthalmology, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

[4]Grupo Obesidómica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, España.

Se solicitó permiso a la revista Acta Ophthalmologica para reproducir dichos resultados en este capítulo de la presente tesis doctoral (ver Anexo VIII). En este artículo, como doctoranda, efectué las labores de análisis, interpretación y contextualización de los resultados de secuenciación, así como la redacción de los mismos para su posterior publicación. El Dr. Manuel Bande, miembro de la URQTIA y del grupo de Investigación en Tumores Intraoculares del Adulto del Idis, participó en el estudio clínico de los pacientes y en el análisis

estadístico de los datos. Los doctorandos Daniel Fernández-Díaz (Servicio de Oftalmología del CHUS) y Nerea Lago-Baameiro (Grupo de Obesidómica-Idis) participaron en el registro de los datos clínicos y procesado de las muestras, respectivamente. La Dra. María José Blanco-Teijeiro miembro de la URQTIA y el grupo de tumores intraoculares del adulto-Idis, efectuó las labores de atención clínica de los pacientes proporcionando las muestras a estudio de cada especímen, así como los datos clínicos requeridos para el estudio. Por otro lado, la Dra. María Pardo (Investigadora principal del Grupo de Obesidómica-Idis), participó en la contextualización de los resultados y revisión del manuscrito en base a su amplia experiencia en los estudios moleculares en melanoma uveal. El Dr. Antonio Piñeiro, miembro de la URQTIA e investigador principal del grupo de investigación en Tumores Intraoculares del Adulto y la Dra. Lourdes Loidi, jefa de laboratorio de la FPGMX, ambos directores de la presente tesis doctoral, dirigieron en equidad el presente estudio abordándolo desde las vertientes clínica y genética, respectivamente. Finalmente, el Dr. Fernando Domínguez, director técnico de la FPGMX y catedrático de universidad en la USC, como tutor de la tesis doctoral, participó en la contextualización académica del estudio.

C3. 4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y MUESTRAS TUMORALES ANALIZADAS

De los 46 pacientes estudiados, el 37% eran mujeres, mientras que el 63% eran varones, siendo todos ellos de origen caucásico. El rango de edad de los pacientes correspondiente a la primera fecha de consulta osciló entre los 40 y los 91 años, con una edad media de 68 años. El tiempo de seguimiento medio fue de 31,17 meses (rango, 6,10-51,90). De todos los pacientes, un 19,6% (9/46) desarrollaron metástasis durante el tiempo de seguimiento en este estudio, siendo el tiempo medio para el desarrollo de metástasis después del tratamiento local de 15 meses (mediana:14,5 meses; rango:3-28). Por otro lado, la mayor parte de las lesiones metastásicas en estos 9 pacientes, fueron descritas a nivel hepático (78%). Aunque, al menos 3 pacientes mostraron, además, extensión a otros órganos como pulmón, ganglios, bazo, hueso e incluso lesiones a nivel subcutáneo.

Las muestras tumorales estudiadas se obtuvieron en gran medida tras la toma de fragmentos tumorales después del tratamiento local mediante enucleación (22/46; 48%), endorresección del tumor (5/46;11%) o por toma de muestra mediante BAAF (19/46; 41%). La mayor parte de los tumores estudiados se ubicaban a nivel del coroides (35/46; 76%), mientras que el 24% (11/46) mostraban implicación del cuerpo ciliar. El diámetro basal medio de los tumores se situó en 12,96 mm (rango:6,10-19,12 mm) y la altura media fue de 7,19 mm (rango:1,30-15,05). Un 30% (14/46) de los tumores mostraban morfología en “champiñón”, un 67% (31/46) presentaba morfología nodular y, sólo en uno de los melanomas analizados no se disponía de esta información. Por otro lado, a nivel histológico, se vio que 17 de los tumores presentaban células de tipo epitelioide (17/46; 37%), 3 tumores mostraban células fusiformes (3/46; 7%), 8 pacientes mostraron un patrón celular mixto (8/46; 17%) y en 18 (39%) no se disponía de esta información. En su mayoría, los especímenes estudiados fueron de tipo melanótico (39/46; 85%), el 13% (6/46) amelanóticos y una de las muestras mostró ambos patrones de pigmentación, por lo que se consideró mixto (1/46;2%).

C3. 4.2 RESULTADO DE LAS ALTERACIONES SOMÁTICAS EN EL NÚMERO DE COPIAS (MLPA)

Los resultados de la presencia de alteraciones cromosómicas fueron recolectados de los obtenidos en el estudio previo de MLPA para las 46 muestras aquí incluidas. Sólo en 3 muestras (6,5%) (U24, U27, U38), no se contaba con resultado de MLPA dada la baja concentración de ADN tumoral.

Los tumores se clasificaron en el grupo de alto o bajo riesgo en función de si presentaban, o no, M3; un 48% (22/46) mostró M3, mientras que un 46% (21/46) se ubicaron en el grupo de bajo riesgo (D3). Para los 3 tumores restantes (6,5%), no se obtuvo clasificación, ya que el resultado obtenido no fue fiable debido a la escasez de ADN tumoral obtenido. Dentro del grupo de alto riesgo (MU-M3), se incluyeron pacientes que mostraban M3 completa (19/46; 41,3%), 2 melanomas (U35 y U41) con M3 en mosaico (2/46; 4,3%) y una sola muestra (U39) con M3 parcial (2,2%) que mostró pérdida de la región 3p y mantenimiento de la región 3q.

Nueve muestras mostraron pérdida para la región cromosómica 1p (9/46; 19,6%), de las cuales la mayoría pertenecían al grupo de tumores de alto riesgo (8/9; 89%), y sólo 1 de ellos pertenecía al grupo de bajo riego (11%).

En cuanto a las alteraciones del cromosoma 6, 9 muestras presentaron ganancia de la región cromosómica 6p (9/46;19,6%) y 3 pérdida de 6q (3/46; 6,5%). Un total de 5 muestras (5/46; 11%) mostraron la posible presencia de un isocromosoma 6p (i6p).

Se detectó ganancia exclusiva de la región 8q en un 37% (17/46) de las muestras, de las cuales un 59% (10/17) presentaba M3 y el 41% (7/17) restante, fue ubicado en el grupo de bajo riesgo. Asimismo, se detectaron 6 muestras con pérdida de la región 8p que, a su vez, mostraban la coexistencia de ganancia 8q (6/46; 13%), sugiriendo la posible presencia de un isocromosoma 8q (i8q). De las 6 posibles muestras con i(8q), 4 se ubicaron en el grupo de alto riesgo (4/6;67%) y 2 en el de bajo riesgo. Una de las muestras analizadas (U37) mostró, presuntivamente, la presencia de ambos isocromosomas i(6p) e i(8q).

C3. 4.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL PERFIL MUTACIONAL

Todos los tumores a excepción de 2 (4%), mostraron mutaciones en alguno o varios de los genes incluidos en el panel diseñado.

A continuación, se describen las mutaciones identificadas en los genes con mutaciones iniciadoras (*GNAQ*, *GNA11* y *PLCB4*) y posteriormente en los genes con valor pronóstico en el MU (*BAP1*, *SF3B1* y *EIF1AX)*. Se muestran, además, los resultados de secuenciación obtenidos para los genes *LZTS1 y BRAF*.

La distribución de las mutaciones detectadas en dichos genes, así como las alteraciones cromosómicas identificadas en cada MU se detallan en la imagen adjunta en el ANEXO III de esta tesis doctoral.

C3. 4.3.1 Mutaciones en genes con función oncogénica

Todas las muestras tumorales analizadas salvo 3 (3/46;6.5%), presentaron mutaciones en alguno de los genes con función oncogénica incluidos en el panel (*GNAQ*, *GNA11* o *PLCB4*). En este apartado, también se indican los resultados obtenidos mediante secuenciación capilar del *hostpot* mutacional localizado en el gen *CYSLTR2*. Las mutaciones identificadas siguieron, en su mayoría, un patrón excluyente. A continuación, se detalla la relación de mutaciones identificadas en estos genes.

C3. 4.3.1.1 Mutaciones en los genes *GNAQ* y *GNA11*

La mayor parte de las muestras tumorales (40/46; 87%) mostraron mutaciones en *GNAQ* o *GNA11*. Del total de estas 40 muestras, un 52% mostró una mutación en el gen *GNAQ* (24/46), mientras que el 35% restante presentó una mutación en *GNA11* (16/46). Entre las mutaciones detectadas en *GNAQ* se vio que todas eran de tipo *missense* y afectaban a los dos *hotspot* mutacionales identificados en este gen; los residuos aminoacídicos p.R209 (exón 5) o p.R183 (exón 4). Específicamente, el 22% mostraron la mutación c.626A>T; p.Q209L (10/46), un 17% la c.626A>C; p.Q209P (8/46), un 2% la c.626A>G; p.Q209R (1/46), el 4% la c.626A>C; p.Q209H (2/46), sólo un 2% la c.625_626AT; p.Q209I (1/46) y, finalmente, un 4% la mutación c.548G>A; p.R183Q (2/46).

En el caso del gen *GNA11*, todas las mutaciones fueron de tipo *missense* y se presentaron en el residuo p.Q209 (exón 5). Un 33% mostraron la mutación c.626A>T; p.Q209L (15/46) y una muestra presentó la mutación c.625_627TAT; p.Q209Y (1/46; 2%). Para este gen, ninguna de las muestras analizadas mostró mutaciones en el residuo p.R183 situado en el exón 4.

Los 9 pacientes que desarrollaron metástasis durante el tiempo de seguimiento de este estudio, presentaron uno de estos dos genes mutados. De manera específica, 5 pacientes mostraron mutaciones en *GNAQ*, 2 pacientes la mutación p.Q209P y 3 pacientes la mutación p.Q209L. Los otros 4 pacientes con metástasis, por el contrario, presentaban todos ellos la mutación p.Q209L en el gen *GNA11*.

C3. 4.3.1.2 Mutaciones en *PLCB4*

En el gen *PLCB4* se detectaron variantes genéticas en 9 de las muestras estudiadas (9/46;19,5%). Todas las variantes identificadas fueron de tipo *missense* y sólo dos de ellas, detectadas en los pacientes U3 y U43 (2/46; 4.3%), implicaban al residuo aminoacídico localizado en el *hotspot* mutacional descrito para este gen (p.D630). En el paciente U3, se detectó la mutación c.1888G>A; p.D630N. En esta misma muestra se detectó, además, coocurrencia de la mutación p.R183Q situada en el exón 4 del gen *GNAQ*. Por otro lado, el paciente U43, mostró la mutación c.1889A>G; p.D630G.

En los 7 pacientes restantes, ninguna de las mutaciones había sido previamente descrita en relación al MU, y 5 de ellos mostraron coexistencia de mutaciones en el gen *PLCB4* y mutaciones en *GNAQ* o *GNA11*. Ninguna de las variantes *missense* identificadas en estos 7 pacientes fue previamente descrita en la base de datos COSMIC en relación a MU ni tampoco a otros tipos de cáncer y se desconoce su efecto sobre la proteína sintetizada.

En la tabla adjunta a continuación, se resumen las características de las variantes identificadas en estos 7 pacientes, encontrándose en alguno hasta 2 variantes con frecuencias poblacionales nulas o extremadamente raras en este gen (Tabla 36).

Id	Mx	Cambio ADN	Exón/intrón	VAF (%)	Efecto	Clasificación	Id COSMIC
U3	NO	c.1888G>A	exón 23	18	p.Asp630Asn	Patogénica	COSM1681538
U4	SI	c.1346C>T	exón 15	15	p.Pro449Leu	Sig.Incierto; probablemente patogénica	-
U9	NO	c.1129A>C	exón 15	21	p.Lys377Glu	Sig.Incierto; probablemente patogénica	-
U12	NO	c.1760A>G	exón 22	50	p.Asn587Ser	Sig.Incierto	-
U15	NO	c.758C>A c.2830A>G	exón 13 exón 31	50 40	p.Pro253His p.Lys944Glu	Sig.Incierto; probablemente patogénica	-
U35	SI	c.833A>T	exón 13	53	p.Asp278Val	Sig.Incierto	-
U40	NO	c.1821T>G	exón 19	50	p.His607Gln	Sig.Incierto; probablemente benigna	-
U42	NO	c.2206A>G	exón 26	11	p.Lys736Glu	Sig.Incierto; probablemente patogénica	-
U43	NO	c.1889A>G	exón 23	43	p.Asp630Gly	Patogénica	-

Tabla 36: Resumen detallado de las variantes genéticas identificadas en el gen *PLCB4*. Abreviaturas: Id: código de identificación de la muestra; **Mx:** metástasis; **VAF:** variant allele frequency; **Sig.Incierto:** significado incierto; **Id COSMIC:** código de identificación en la base de datos COSMIC.

C3. 4.3.1.3 Mutaciones en *CYSLTR2*

La secuenciación capilar mediante el método de Sanger fue llevada a cabo para el *hotspot* mutacional p.Leu129Gln, en 46 muestras. Este procedimiento se desarrolló con éxito en todas las muestras menos en 12, de las cuales no se disponía de material genético suficiente. No se detectó la mutación en ninguna de las muestras.

C3. 4.3.2 Mutaciones en genes con valor pronóstico

En este apartado se detallan los resultados obtenidos de la secuenciación de los genes con valor pronóstico incluidos en el panel diseñado (*BAP1*, *SF3B1* y *EIF1AX*). Del total de muestras secuenciado, un 33% (15/46) de los tumores no mostraron ninguna alteración patogénica, probablemente patogénica o de significado incierto en las regiones secuenciadas de los tres genes estudiados. De estos tumores, 8

se ubicaron en el grupo de bajo riesgo de metástasis, 5 en el grupo de alto riesgo y 2 no fueron clasificados debido a la escasez de ADN, aunque sí mostraron la presencia de mutaciones en los genes iniciadores (*GNAQ* y *GNA11*).

C3. 4.3.2.1 Mutaciones en *BAP1*

La secuenciación de la región codificante y regiones intrónicas flanqueantes (±10pb) del gen *BAP1*, se logró con éxito en todas las muestras. El 33% de las muestras secuenciadas mostraron variantes en este gen. Se detectaron un total de 17 variantes genéticas en 16 muestras, presentando 2 de ellas (U32 y U41) la coexistencia de 2 variantes distintas. Ocho variantes fueron de tipo truncante; 6 deleciones *frameshift* y 2 mutaciones *nonsense*. Por otro lado, se detectaron 7 variantes en puntos de *splicing*, algunos de ellos no canónicos, y 2 sustituciones *missense*. De todas las variantes identificadas, 8 no habían sido descritas previamente en relación al MU ni tampoco a ningún otro tipo de cáncer en la base de datos COSMIC.

Todas las variantes detectadas fueron clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas a excepción de la variante *missense* p.Glu125Asp, la variante de *splicing* c.2057-4G>T y la variante sinónima p.Leu334Leu identificada en la muestra U8. La primera, no había sido descrita en relación al MU pero sí en relación al carcinoma renal de células claras (COSM6968269). No obstante, tratándose de una variante *missense* con valores contradictorios de patogenicidad, fue considerada como de significado incierto en relación al MU, aunque probablemente patogénica.

La variante c.2057-4G>T, detectada en 2 muestras (U20 y U41), fue descrita en la base de datos COSMIC (COSM96371) como probablemente benigna en relación a mesotelioma y carcinoma del tracto digestivo superior.

Finalmente, la variante sinónima p.Leu334Leu no parece tener efectos sobre el patrón de *splicing* y fue clasificada en la base de datos COSMIC como neutral (COSM5020138).

La segunda de las variantes *missense* identificada en el estudio (p.Gly185Arg), fue clasificada como patogénica en relación al MU. Esta variante no había sido descrita en la base de datos GnomAD, por lo que no existen datos de frecuencia asociados a la misma, aunque sí

se describió como patogénica en la base de datos COSMIC en relación a carcinoma de riñón y carcinoma de conducto biliar (COSM4410937). De acuerdo a los 5 predictores de patogenidad tenidos en cuenta en este estudio, esta sustitución podría tener un efecto deletéreo sobre la proteína sintetizada. Por todo ello, fue clasificada como patogénica.

La variante de tipo *nonsense* p.R385Ter, se detectó 2 veces en muestras distintas (U21 y U36), ambas con M3. Se trata de una mutación ya conocida y descrita en COSMIC (COSM48859) en relación a múltiples tipos de cáncer incluyendo el melanoma ocular. Uno de los 2 pacientes en los cuales se detectó esta mutación somática, desarrolló metástasis durante el transcurso de este estudio.

La mayor parte de las variantes detectadas en el gen *BAP1* fueron descritas en la base de datos COSMIC en relación a MU o a otros tipos de cáncer. Mientras 8 variantes no habían sido reportadas en relación a MU ni tampoco a otros tipos de cáncer.

Todas las variantes detectadas en *BAP1* se resumen en la tabla 37 adjunta a continuación. Se muestra, asimismo, un esquema de la distribución de las mismas a lo largo de los distintos exones del gen y los diferentes dominios proteicos codificados por el mismo (Figura 35).

Las variantes detectadas se ubicaron, fundamentalmente, en tumores pertenecientes al grupo de alto riesgo (MU-M3) (13/16; 81,3%) y 2 variantes fueron halladas en muestras ubicadas en el grupo de bajo riesgo (U20 y U33). La variante detectada en la muestra U33 fue descrita en la base de datos COSMIC (COSM96371) como probablemente benigna.

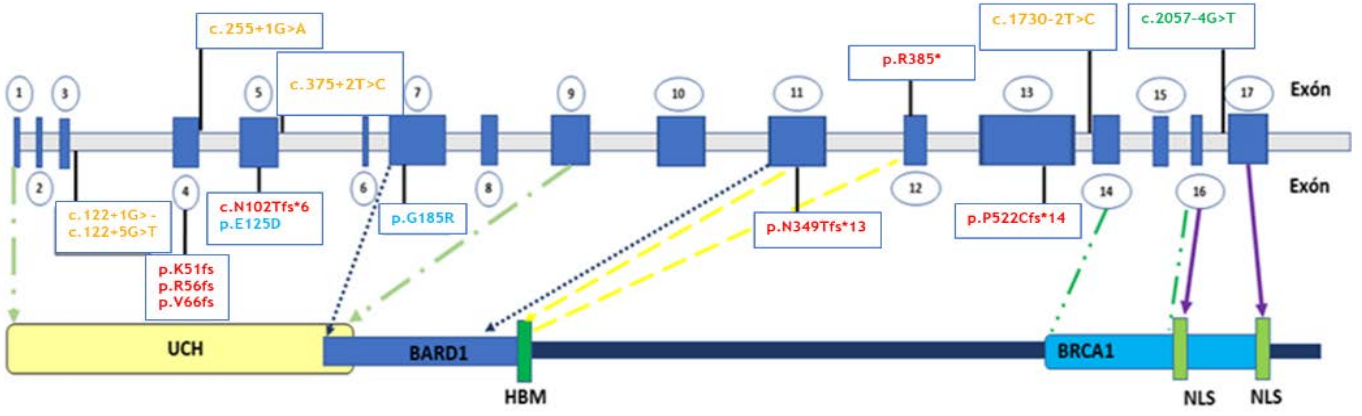


Figura 35: Figura representativa de los 17 exones del gen *BAP1* (GRCh37(hg19); transcrito NM_00456.3) y sus correspondientes dominios proteicos. Se muestra la ubicación de las variantes identificadas en la cohorte de pacientes estudiada. Mutaciones de tipo *missense* en azul; mutaciones que provocan la aparición de un codón de parada prematuro en rojo; variantes probablemente benignas en verde, variantes en posiciones de *splicing* en naranja (Imagen de creación propia para la presente tesis doctoral).

Id	Cr 3	Mx	Cambio en el ADN	exón/ intrón	VAF (%)	Cambio en la proteína	Efecto	Clasificación	COSMIC Id	Tipo de cáncer
UM4	M3	si	c.375G>T	5	92	p.E125D[a]	missense	**significado incierto**	COSM6968269	carcinoma renal de células claras
UM5	M3	si	c.168_192del25	4	57	p.R56fs	terminación prematura	**patogénica**		
UM6	M3		c.255+1G>A	4	77	p.?	*splicing*	**patogénica**	COSM6951224	mesotelioma
UM14	M3		c.153delA	4	92	p.K51fs	terminación prematura	**patogénica**	COSM6848449	mesotelioma
UM17	M3		c.198_208del10	4	66	p.V66fs	terminación prematura	**patogénica**		
UM20	D3	si	c.553G>A	7	85	p.G185R[b]	missense	**patogénica**	COSM4410937	carcinoma de riñón y conducto biliar
UM21	M3		c.1153C>T	12	91	p.R385*	terminación prematura	**patogénica**	COSM48859	melanoma ocular maligno y otros
UM26	M3		c.375+2T>C	5	89	p.?	*splicing*	**patogénica**	COSM6941426	melanoma ocular maligno
UM31	M3	si	c.305_320del15	5	56	p.Asn102Thrfs*6	terminación prematura	**patogénica**		
UM32	M3	si	c.1044delC c.1730-2A>C	11 13	62 22	p.Asn349Thrfs*13 p.?	terminación prematura splicing	**patogénica**		
UM33	D3		c.2057-4G>T	16	46	p.?	*splicing*	**probablemente benigna**	COSM96371	mesotelioma carcinoma del tracto aerodigestivo superior
UM35	mos	si	c.1564_1565del2	13	78	p.P522Cfs*14	terminación prematura	**patogénica**		
UM36	M3	si	c.1153C>T	12	88	p.R385*	premature termination	**patogénico**	COSM48859	melanoma ocular maligno y otros
UM41	mos		c.122+5G>T c.2057-4G>T	intrón 3 intrón 16	54 72	p.? p.?	*splcing* *splicing*	probablemente patogénica y benigna	COSM96371	mesotelioma carcinoma del tracto aerodigestivo superior
UM46	M3		c.122+1G>-	intrón 3	95	p.?	*splicing*	patogénico		

Tabla 37: Resumen detallado de las variantes detectadas en el gen *BAP1*. Abreviaturas: Id: identificación de la muestra; **Cr3:** estado del cromosoma 3, **M3:** monosomía 3, **MP3:** monosomía parcial 3, **D3:** disomía 3; **Mx:** metástasis; **VAF**: variant allele frequency; **Id COSMIC:** código de identificación en la base de datos COSMIC.

C3. 4.3.2.2 Mutaciones en *SF3B1*

Para el gen *SF3B1* se detectaron variantes, en heterocigosis, en un 22% de las muestras estudiadas (10/46). Todas las variantes identificadas implican al residuo aminoacídico p.R625, localizado en el *hotspot* mutacional del exón 14 definido para este gen en el MU. En el *hotspot* p.R625, 3 de las muestras mostraron la mutación c.1873 C>T; p.R625C (COSM110696), 6 mostraron la mutación c.1874 G>A; p.R625H (COSM255276) y sólo uno de los MU presentó la mutación c.1874G>T; p.R625L (COSM110695). Las 3 mutaciones fueron descritas en relación a MU en la base de datos COSMIC (Tabla 38).

Id	Cr3	Mx	Cambio ADN	VAF (%)	Efecto	Clasificación	Id COSMIC
U7	D3	NO	c.1874 G>A	40	p.R625H	patogénica	COSM255276
U8	D3	NO	c.1873 C>T	43	p.R625C	patogénica	COSM110696
U11	D3	NO	c.1874 G>A	40	p.R625H	patogénica	COSM255276
U12	D3	NO	c.1873 C>T	8	p.R625C	patogénica	COSM110696
U18	D3	NO	c.1874 G>A	45	p.R625H	patogénica	COSM255276
U22	D3	NO	c.1874 G>A	44	p.R625H	patogénica	COSM255276
U27	n/a	NO	c.1874 G>A	37	p.R625H	patogénica	COSM255276
U28	M3	NO	c.1874 G>A	55	p.R625H	patogénica	COSM255276
U37	D3	NO	c.1873 C>T	43	p.R625C	patogénica	COSM110696
U39	MP3	NO	c.1874G>T	39	p.R625L	patogénica	COSM110695

Tabla 38: Resumen detallado de las variantes detectadas en el gen *SF3B1*. **Abreviaturas: Id:** identificación de la muestra; **Cr3:** estado del cromosoma 3, **M3:** monosomía 3, **MP3:** monosomía parcial 3, **D3:** disomía 3; **Mx**: metástasis; **VAF**: variant allele frequency; **Id COSMIC:** código de identificación en la base de datos COSMIC.

Un 70% (7/10) de los MU con mutaciones en *SF3B1* presentaron D3 y fueron ubicados en el grupo de bajo riesgo. Sólo 2 tumores con este gen mutado se ubicaron en el grupo de alto riesgo; uno con M3 completa (U28) y otro con M3 parcial (U39). La muestra U27, no pudo ser clasificada debido a la escasez de ADN tumoral obtenida. Las mutaciones detectadas en este gen siguieron un patrón excluyente con

las detectadas en los genes *BAP1* y *EIF1AX*. Sólo una de las muestras con este gen mutado presentó una variante en *BAP1*, tratándose de un cambio de tipo sinónimo sin efectos deletéreos aparentes sobre la proteína sintetizada y clasificada como neutral en la base de datos COSMIC.

Ninguno de los pacientes con mutaciones en *SF3B1* desarrolló lesiones metastásicas en el transcurso de este estudio.

C3. 4.3.2.3 Mutaciones en *EIF1AX*

Siete (15%; 7/46) de los MU mostraron variantes en *EIF1AX*, en hemicigosis o heterocigosis, ubicadas todas entre los exones 1 y 2 del mismo (Tabla 39). Seis variantes fueron de tipo *missense* y la muestra U19 mostró una deleción en el gen sin ruptura de la pauta de lectura (deleción *inframe*). Todas las variantes detectadas, a excepción de 2, fueron descritas en COSMIC.

La variante detectada en el melanoma U10 no consta en COSMIC, pero hay descritas otras variantes de tipo *missense* patogénicas en relación a MU en el mismo residuo aminoacídico (p.G6).

De los 7 pacientes con *EIF1AX* mutado, la mayor parte (5/7; 71%) se ubicaron en el grupo de bajo riesgo (MU-D3), y sólo 2 en el grupo de alto riesgo (MU-M3) (U19, U25).

Por otro lado, todas las muestras con este gen mutado mostraron ausencia de mutaciones en los genes *BAP1* y *SF3B1*. La muestra U33 fue la única que mostró coexistencia con una variante en el gen *BAP1*, pero descrita como probablemente benigna.

Ninguno de los pacientes que presentaban un MU con *EIF1AX* mutado desarrolló metástasis a lo largo del estudio.

Id	Cr3	Mx	Cambio ADN	VAF (%)	Efecto	Clasificación	Id COSMIC
U1	D3	NO	c.12T>A	99	p.Asn4Lys	patogénica	COSM7366019
U10	D3	NO	c.17G>T	92	p.Gly6Val	patogénica	
U16	D3	NO	c.17G>A	95	p.Gly6Asp	patogénica	COSM3736694
U19	D3	NO	c.39_41del	98	p.Arg14del	patogénica	
U25	D3	NO	c.44G>T	92	p.Gly15Val	patogénica	COSM3973543
U33	D3	NO	c.37C>T	46	p.Arg13Cys	patogénica	COSM5899335
U40	n/a	NO	c.5C>G	5	p.Pro2Arg	patogénica	COSM1666116

Tabla 39: Resumen detallado de las variantes detectadas en el gen *EIF1AX*. Abreviaturas: Id: identificación de la muestra; **Cr3:** estado cromosoma 3, **M3:** monosomía 3, **D3:** disomía 3; **Mx**: metástasis; **VAF**: variant allele frequency; **Id COSMIC:** código de identificación en la base de datos COSMIC.

C3. 4.3.3 Mutaciones identificadas en los genes *LZTS1* y *BRAF*

C3. 4.3.3.1 Gen *LZTS1*

Las muestras U9 y U33 son las únicas que presentaron variantes en el gen *LZTS1* (Tabla 40).

La muestra U9 presentó una variante de tipo *missense* no descrita en la base de datos poblacional GnomAD, por lo que no existen datos de frecuencia asociados a la misma. Las predicciones *in silico* para esta variante resultaron ser contradictorias (dann 0,993; SIFT 0,001 (D); REVEL 0,2029 (benigna); CADD:26,2; Polyphen: 1 (D)). Por ello, fue considerada como de significado incierto en relación al MU.

En el caso de la muestra U33, la variante identificada se encontraba en la región reguladora 3`UTR desconociéndose el efecto de la misma sobre la proteína codificada por este gen.

Id	Cr3	Mx	Cambio en el ADN	VAF (%)	Efecto	Clasificación
U9	M3	no	c.26C>G	89	p.Ser9Cys	Significado Incierto
U33	D3	no	c.34*G>A	51	p.?	Probablemente benigna

Tabla 40: Resumen detallado de las variantes detectadas en el gen *LZTS1*.

C3. 4.3.3.2 Gen *BRAF*

En el caso del gen *BRAF*, ninguna de las muestras de MU secuenciadas en este estudio presentó mutaciones en la región del *hotspot* mutacional descrito para el mismo.

C3. 4.4 RESULTADOS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE EL PERFIL CLÍNICO-MOLECULAR DE LOS MELANOMAS UVEALES Y EL RIESGO DE METÁSTASIS

En este apartado, se muestran los resultados del análisis de asociación estadística entre las distintas variables cualitativas y cuantitativas valoradas y el riesgo de metástasis en los pacientes en estudio.

C3. 4.4.1 Características clínicas e histopatológicas y riesgo de metástasis

El análisis de la asociación entre las diferentes características clínicas, histopatológicas y demográficas incluidas en este estudio, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el riesgo de aparición de lesiones metastásicas y el tamaño del tumor (altura y base), el sexo, la localización intraocular del tumor o el tipo celular del mismo. Sin embargo, la asociación sí resultó significativa para la edad media de los pacientes (p-valor=0,019) (Tabla 41).

		Metástasis								
		No				Sí				
		Media	DS	n	%	Media	DS	n	%	p-valor
Edad		65,87	12,75			77,12	10,63			**0,019**
EcoBI		12,64	3,31			14,25	2,96			0,10
EcoAI		6,77	3,25			8,93	4,38			0,19
Sexo	**Mujer**			14	37,8			3	33,3	0,80
	Hombre			23	62,2			6	66,7	
Localización	**Posterior**			9	24,3			2	22,2	0,75
	Coroides			20	54,1			4	44,4	
	Cuerpo ciliar			8	21,6			3	33,3	
Tipo celular	**Epitelioide**			12	60,0			5	62,5	0,46
	Fusiforme			3	15,0			0	0,0	
	Mixto			5	25,0			3	37,5	

Tabla 41: Asociación entre las características clínicas, demográficas e histopatológicas y el riesgo de aparición de metástasis.

C3. 4.4.2 Alteraciones cromosómicas y riesgo de metástasis

En cuanto a las alteraciones cromosómicas estudiadas, se vio que existía una relación estadísticamente significativa entre el riesgo de aparición de metástasis y la presencia de M3 (p-valor = 0,011), así como para las pérdidas de las regiones cromosómicas 6q (p-valor = 0,001) y 8p (p-valor = 0,059). Específicamente, el 88,9% de los pacientes que desarrollaron metástasis a lo largo de este estudio, presentaban M3, mientras que sólo 1 de los 9 pacientes con metástasis presentó dosis normal para el cromosoma 3 (11,1%).

Para la presencia de pérdidas en el cromosoma 1p, ganancias en el cromosoma 8q o ganancias en el cromosoma 6p, los resultados obtenidos en esta cohorte de pacientes no fueron estadísticamente significativos en el momento de este estudio, obteniendo p-valor de 0,91; 0,95 y 0,1, respectivamente (Tabla 42).

		Metástasis				
		No		Sí		p-valor
		n	%	n	%	
Pérdida Cr1	No	27	79,4	7	77,8	0,91
	Sí	7	20,6	2	22,2	
Pérdida Cr3	No	20	58,8	1	11,1	**0,011**
	Sí	14	41,2	8	88,9	
Ganancia Cr6p	No	23	67,6	6	66,7	0,95
	Sí	11	32,4	3	33,3	
Pérdida Cr6q	No	31	91,2	4	44,4	**0,001**
	Sí	3	8,8	5	55,6	
Ganancia Cr8q	No	18	52,9	2	22,2	0,10
	Sí	16	47,1	7	77,8	
Pérdida Cr8p	No	31	91,2	6	66,7	**0,059**
	Sí	3	8,8	3	33,3	

Tabla 42: Descripción detallada de la prevalencia de las distintas alteraciones cromosómicas estudiadas y su relación con el desarrollo de metástasis en la cohorte analizada.

C3. 4.4.3 Mutaciones somáticas y riesgo de metástasis

Se vio que existía una relación estadísticamente significativa entre la aparición de metástasis y la presencia de mutaciones en el gen *BAP1* (p-valor = 0,001). Sin embargo, la presencia de mutaciones en el resto de genes estudiados (*GNAQ, GNA11, PLCB4, LZTS1, SF3B1, EIF1AX*) no mostró una asociación significativa con la aparición de metástasis, tal y como puede apreciarse en la tabla 43.

		Metástasis				
		No		Sí		p-valor
		n	%	n	%	
GNAQ	**No**	18	48,6	4	44,4	0,82
	Sí	19	51,4	5	55,6	
GNA11	**No**	25	67,6	5	55,6	0,50
	Sí	12	32,4	4	44,4	
BAP1	**No**	29	78,4	2	22,2	**0,001 ***
	Sí	8	21,6	7	77,8	
SF3B1	**No**	27	73,0	9	100	0,07
	Sí	10	27,0	0	0,0	
EIF1AX	**No**	30	81,1	9	100	0,16
	Sí	7	18,9	0	0,0	
LZTS1	**No**	35	94,6	9	100	0,48
	Sí	2	5,4	0	0,0	
PLCB4	**No**	30	81,1	7	77,8	0,82
	Sí	7	18,9	2	22,2	

Tabla 43: Descripción detallada de la prevalencia de las distintas mutaciones somáticas en los genes estudiados y su asociación con la presencia de lesiones metastásicas en la cohorte estudiada.

En cuanto a la prevalencia de mutaciones somáticas en los 9 genes en los dos grupos de riesgo según el estado del cromosoma 3 (MU-D3/M3), se vio que existía una asociación estadísticamente significativa para la prevalencia de mutaciones en el gen *BAP1* en el grupo de pacientes que presentaban M3 (p-valor < 0,002).

La presencia de mutaciones en el resto de genes no mostró una preferencia en cuanto a su prevalencia en los grupos D3 y M3, por lo que no se detectaron diferencias significativas para ninguno de los grupos estudiados (Tabla 44).

	Estado del número de copia del cromosoma 3					
		Disomía 3		Monosomía 3		p-valor
		n	%	n	%	
GNAQ	**No**	12	57,1	9	42,9	0,28
	Sí	9	40,9	13	59,1	
GNA11	**No**	13	46,4	15	53,6	0,66
	Sí	8	53,3	7	46,7	
BAP1	**No**	18	66,7	9	33,3	**<0,002***
	Sí	3	18,8	13	81,3	
SF3B1	**No**	14	41,2	20	58,8	0,05
	Sí	7	77,8	2	22,2	
EIF1AX	**No**	16	44,4	20	55,6	0,19
	Sí	5	71,4	2	28,6	
LZTS1	**No**	20	48,8	21	51,2	0,97
	Sí	1	50,0	1	50,0	
PLCB4	**No**	17	50,0	17	50,0	0,76
	Sí	4	44,4	5	55,6	

Tabla 44: Estudio de la asociación entre la presencia de mutaciones en los distintos genes estudiados y el estado del cromosoma 3 en cuanto al número de copia.

Además, se estudió la posible asociación de mutaciones en *BAP1* y la coexistencia de mutaciones en otros genes en un mismo MU, así como para las distintas alteraciones cromosómicas. No se observaron diferencias significativas para ninguno de los genes interrogados (Tabla 45) y sólo la asociación con la M3 resultó estadísticamente significativa (p-valor = 0,002) (Tabla 46).

		BAP1				
		No mutado		Mutado		p-valor
		n	%	n	%	
GNAQ	**No mutado**	16	72,7	6	27,3	0,30
	Mutado	14	58,3	10	41,7	
GNA11	**No mutado**	19	63,3	11	36,7	0,71
	Mutado	11	68,8	5	31,3	
SF3B1	**No mutado**	23	62,2	14	37,8	0,37
	Mutado	7	77,8	2	22,2	
EIF1AX	**No mutado**	21	58,3	15	41,7	0,06
	Mutado	9	90,0	1	10,0	
LZTS1	**No mutado**	24	61,5	15	38,5	0,21
	Mutado	6	85,7	1	14,3	
PLCB4	**No mutado**	29	65,9	15	34,1	0,64
	Mutado	1	50,0	1	50,0	

Tabla 45: Estudio de la asociación entre la presencia de mutaciones en el gen *BAP1* y otras mutaciones en los 6 genes estudiados.

		BAP1				
		No mutado		Mutado		p-valor
		n	%	n	%	
Pérdida 1p	**No mutado**	20	58,8	14	41,2	0,296
	Mutado	7	77,8	2	22,2	
Pérdida 3	**No mutado**	18	85,7	3	14,3	**0,002**
	Mutado	9	40,9	13	59,1	
Ganancia 6p	**No mutado**	16	55,2	13	44,8	0,137
	Mutado	11	78,6	3	21,4	
Pérdida 6q	**No mutado**	22	62,9	13	37,1	0,985
	Mutado	5	62,5	3	37,5	
Ganancia 8q	**No mutado**	14	70,0	6	30,0	0,362
	Mutado	13	56,5	10	43,5	
Pérdida 8p	**No mutado**	24	64,9	13	35,1	0,485
	Mutado	3	50,0	3	50, 0	

Tabla 46: Estudio de la asociación entre la presencia de mutaciones en el gen *BAP1* y alteraciones en los cromosomas estudiados mediante MLPA.

C3. 4.5 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

C3. 4.5.1 Estudio de la supervivencia asociada a la presencia de alteraciones cromosómicas

El estudio de supervivencia mediante curvas Kaplan-Meier y comparaciones mediante el test Log-rank en relación a la presencia de las distintas alteraciones cromosómicas, reveló diferencias significativas para los tumores que presentaban M3 frente a los que mostraron número de copia normal para el cromosoma 3 (Log-rank, p-valor = 0,0097).

En cuanto a la región cromosómica 8q, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas comparando la supervivencia libre de metástasis en pacientes con D3, M3, D3 con ganancia en 8q y M3 con ganancia en 8q (Log-rank; p-valor = 0,11) (Figura 36).

C3. 4.5.2 Estudio de la supervivencia asociada a características clínico-anatómicas

En este apartado, se evaluó la supervivencia libre de metástasis asociada a características clínicas y anatómicas del tumor. En concreto se estudiaron las diferencias en cuanto a supervivencia asociadas al tamaño del tumor y a la localización intraocular del mismo. Para el primero, se tomaron 7mm de altura como referencia para evaluar el tamaño, valorándose la supervivencia en meses de los tumores con menos de 7mm y más de 7 mm de altura tanto en el grupo de pacientes con tumores con D3 como en el grupo de pacientes con tumores con M3, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia para los cuatro grupos estudiados (Log-rank, p-valor = 0,33).

Con respecto a la localización intraocular de los tumores, se evaluó la supervivencia libre de metástasis en los pacientes con MU-D3 o MU-M3 con localización en coroides, polo posterior y cuerpo ciliar. En este caso, tampoco se detectaron diferencias significativas en cuanto a las curvas de supervivencia obtenidas para los cuatro grupos en estudio (Log-rank, p-valor = 0,19) (Figura 37).

C3. 4.5.3 Estudio de la supervivencia asociada a la presencia de mutaciones somáticas en los distintos genes

C3. 4.5.3.1 Genes conductores oncogénicos

En el estudio de las curvas de supervivencia libre de metástasis asociada a la presencia de mutaciones en los genes *GNAQ, GNA11* y *PLCB4,* no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes que presentaban tumores con alguno de estos genes mutados frente a los que no presentaron mutaciones en los mismos (Figuras 38 y Figura 39).

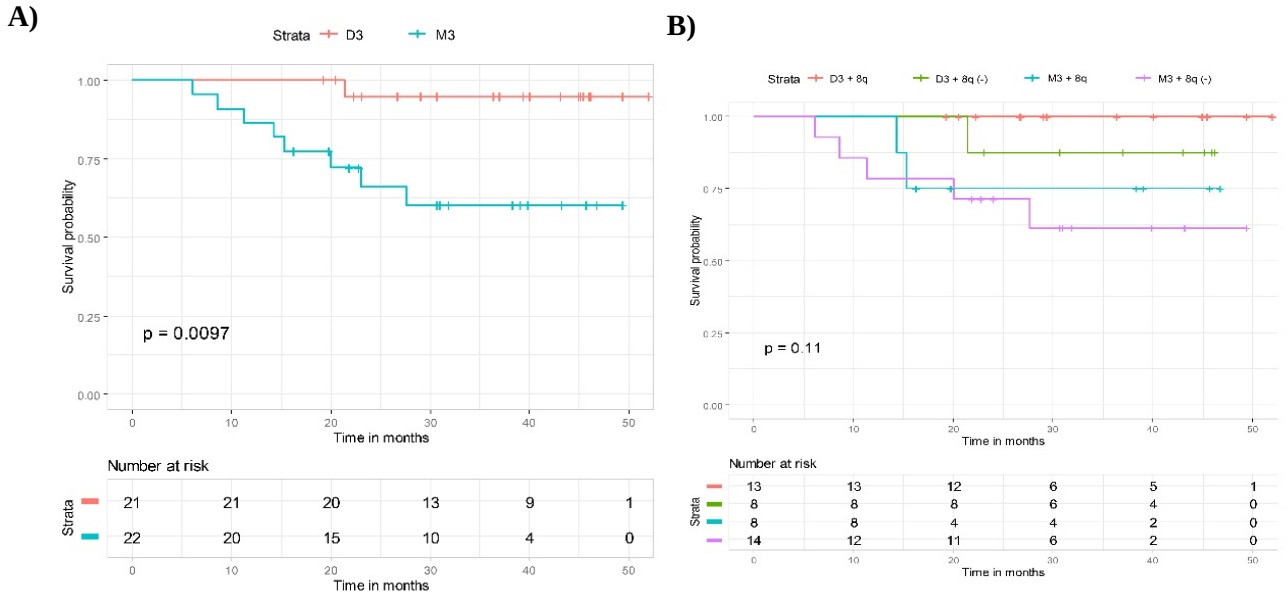


Figura 36: Gráficos de supervivencia para el estudio de alteraciones cromosómicas y supervivencia libre de metástasis en la cohorte de pacientes estudiada. A) Supervivencia de los pacientes con MU-D3 frente a los MU-M3**. B)** Supervivencia de los pacientes con tumores con D3, M3, D3 con ganancia de 8q y M3 con ganancia de 8q.

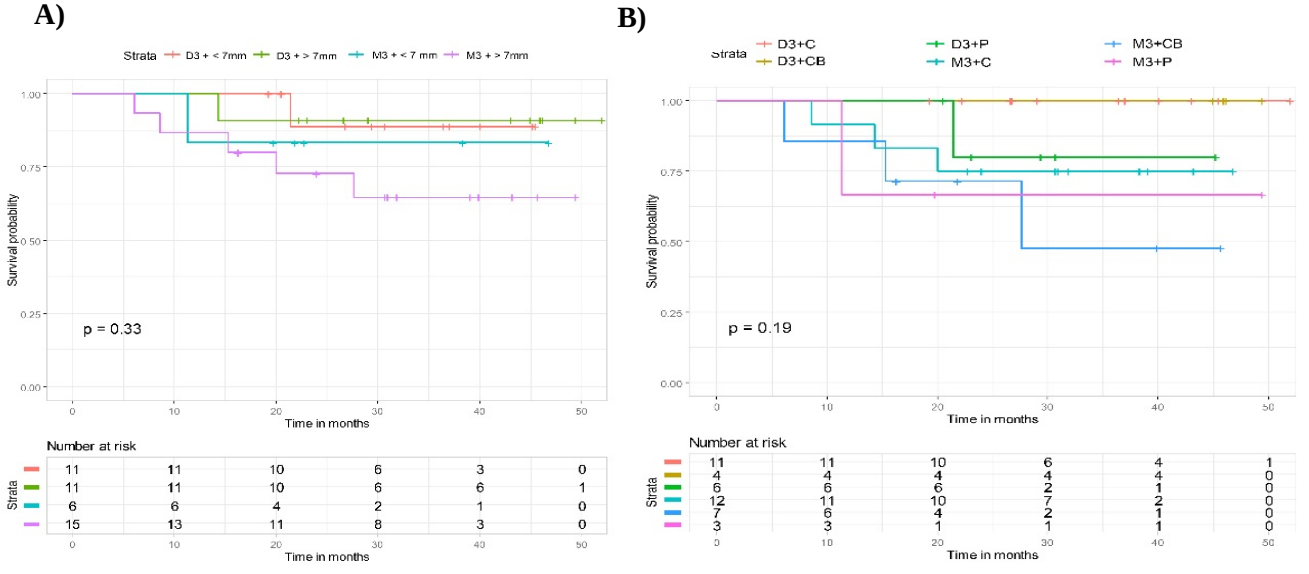


Figura 37: Curvas Kaplan-Meier para la altura tumoral y la localización intraocular del MU. A) Supervivencia de los pacientes con MU-D3 y MU-M3, con alturas inferiores o superiores a 7 mm D3<7mm/D3>7mm/M3<7mm/M3>7mm. **B)** Supervivencia de los pacientes con MU-D3, MU-M3, con localización intraocular en coroides (C), polo posterior (P) o cuerpo ciliar (CB, del inglés, ciliary body); D3-C/D3-P/D3-CC/M3-C/M3-P/M3-CC.

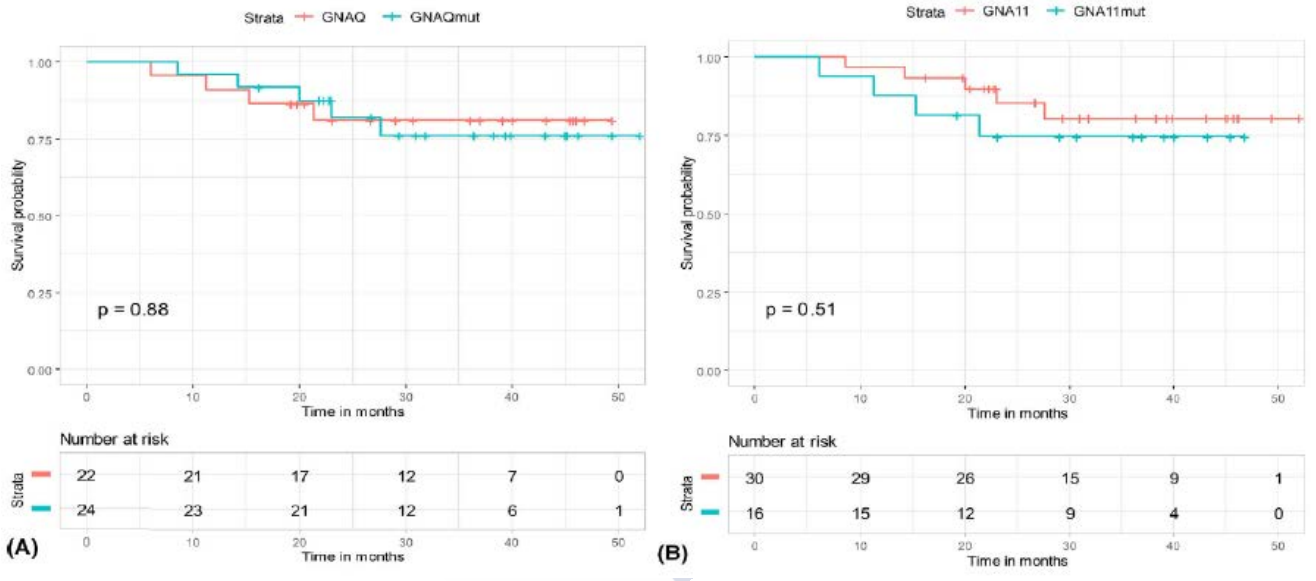


Figura 38: Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para la comparación de la supervivencia libre de metástasis en pacientes con tumores con presencia/ausencia de mutaciones en los genes conductores oncogénicos. A) Supervivencia de los pacientes con tumores *GNAQ* sin mutar y mutado. **B)** Supervivencia de los pacientes con tumores *GNA11* sin mutar y mutado**.**

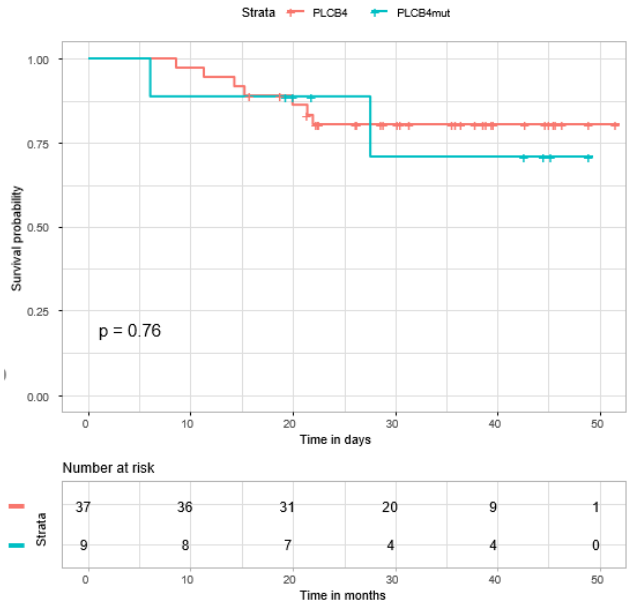


Figura 39: Supervivencia de los pacientes con tumores *PLCB4* sin mutar y mutado.

C3. 4.5.3.2 Genes con valor pronóstico

En este apartado se describen los resultados derivados del estudio de supervivencia libre de metástasis asociada a la presencia de mutaciones en los genes con valor pronóstico estudiados (*SF3B1*, *EIF1AX* y *BAP1*).

Para los genes *SF3B1 y EIF1AX*, la supervivencia libre de metástasis fue evaluada tanto en la cohorte total de pacientes (n=46) como en el grupo de pacientes con MU-D3 (n=21) con el objetivo de poder evaluar su potencial pronóstico de manera independiente al aportado por la M3. Ya que, habitualmente, las mutaciones en estos genes son detectas en MU con D3. A pesar de los análisis independientes, se vio que ni para el gen *SF3B1* ni para el gen *EIF1AX* existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia de los pacientes que presentaban MU con o sin mutaciones en los genes en cuestión (Figuras 40 y 41, respectivamente).

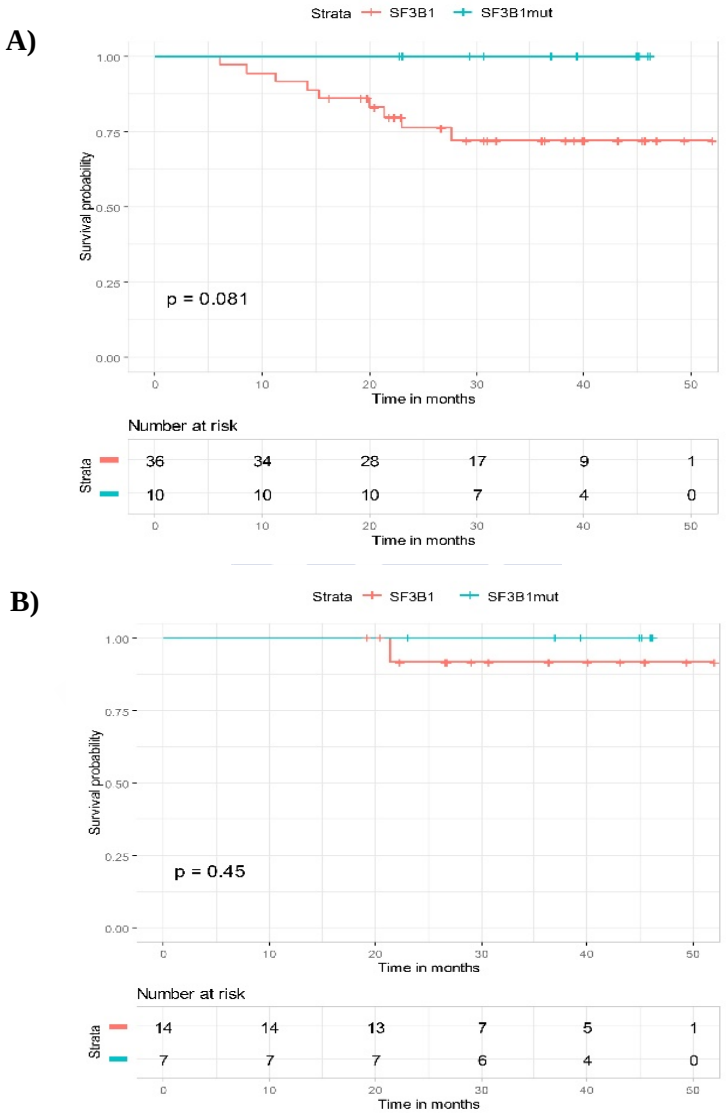


Figura 40: Curvas Kaplan-Meier para la comparación de la supervivencia en pacientes con MU con presencia/ausencia de mutaciones en el gen *SF3B1*. A) Supervivencia de los pacientes con tumores con *SF3B1* sin mutar y mutado en la cohorte global (n=46). **B)** Supervivencia de los pacientes con MU-D3 con *SF3B1* sin mutar y mutado.

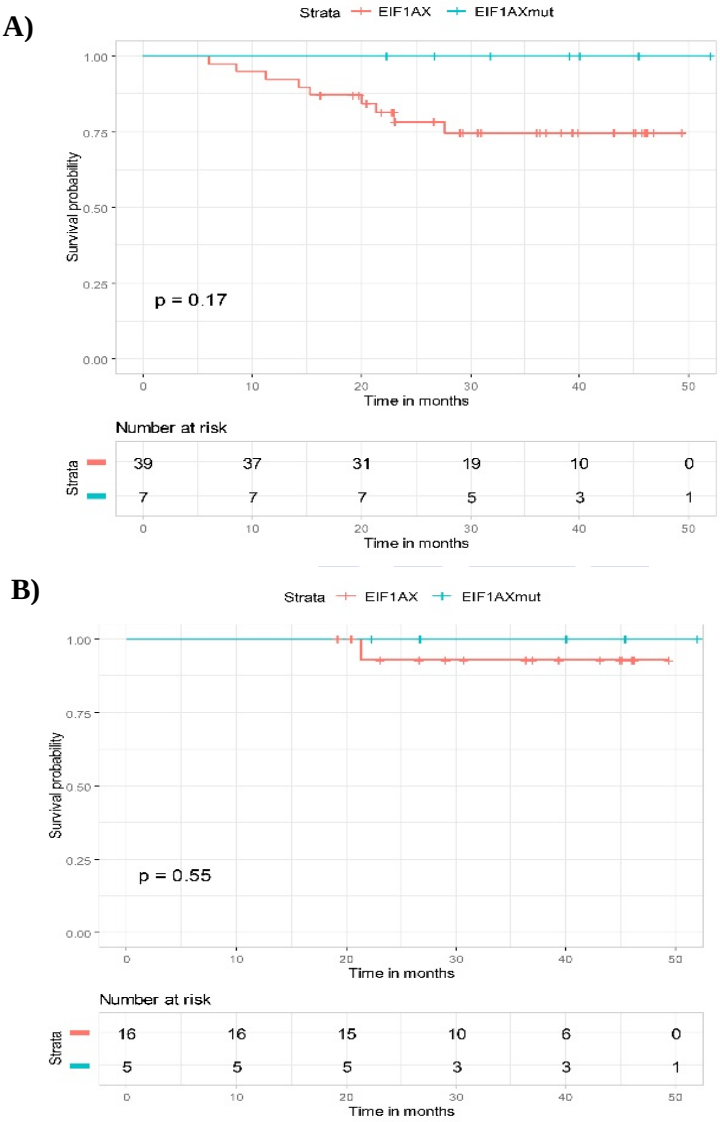
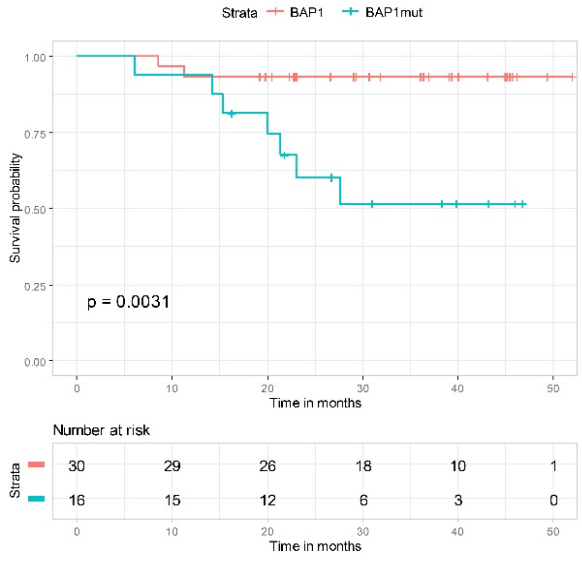


Figura 41: Curvas Kaplan-Meier para la comparación de la supervivencia en pacientes con MU con presencia/ausencia de mutaciones en el gen *EIF1AX*. A) Supervivencia de los pacientes con tumores con *EIF1AX* sin mutar y mutado en la cohorte global (n=46). **B)** Supervivencia de los pacientes con MU-D3 con *EIF1AX* sin mutar y mutado.

En el caso del gen *BAP1,* la supervivencia fue estudiada de manera global en toda la cohorte de pacientes, así como en los grupos de pacientes con MU-D3 o MU-M3 por separado; evaluándose la supervivencia en cuatro posibles grupos (D3-*BAP1* no mutado, D3-*BAP1* mutado, M3-*BAP1* no mutado, M3-*BAP1* mutado). En los pacientes con MU con *BAP1* mutado se observó una reducción significativa de la supervivencia en comparación con los que presentaban *BAP1* sin mutar (p-valor=0,0031). Los pacientes que además de presentar MU-M3 mostraban mutaciones en el gen *BAP1*, presentaron una importante reducción en la supervivencia libre de metástasis (Log-rank; p-valor = 0,022) (Figura 42).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A)



B)

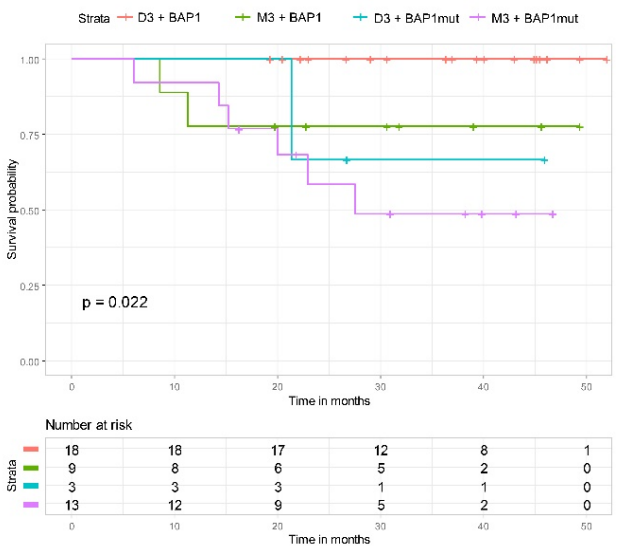


Figura 42: Estudio Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis en pacientes con presencia/ausencia de mutaciones en el gen *BAP1*. A) Supervivencia en la cohorte global de pacientes con MU con *BAP1* mutado y sin mutar (n=46). **B)** Supervivencia de los pacientes con tumores con D3-*BAP1* sin mutar/D3-*BAP1* mutado/M3-*BAP1* sin mutar/M3-*BAP1* mutado.

C3. 4.5.3.3 Gen *LZTS1*

En el caso del gen *LZTS1*, el análisis de supervivencia libre de metástasis para los pacientes con tumores con el gen mutado y sin mutar, no reveló diferencias estadísticamente significativas (Figura 43).

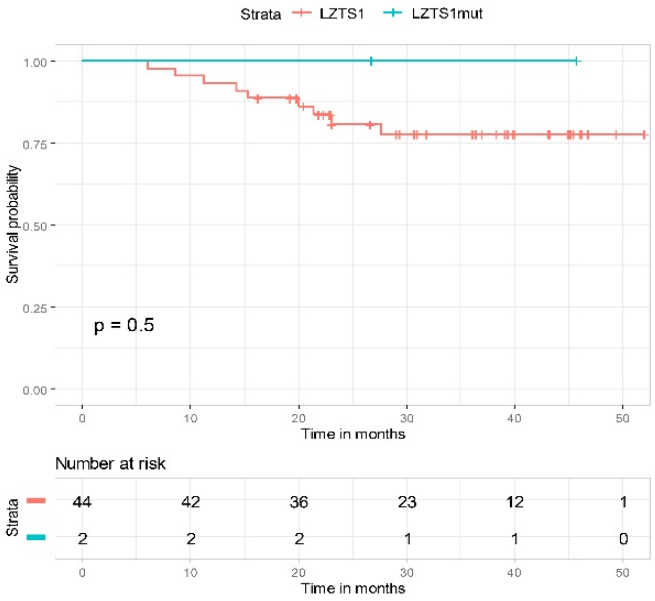


Figura 43: Curva Kaplan-Meier para comparación de la supervivencia libre de metástasis en los pacientes con presencia/ausencia de mutaciones en el gen *LZTS1*.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C3. 5. DISCUSIÓN

El trabajo presentado en este capítulo, se basó en el diseño de un panel de genes específico para el estudio de la presencia de mutaciones somáticas en el MU y su posible significado clínico. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron combinados con la información derivada del estudio de MLPA para los mismos pacientes. Por medio de los datos obtenidos, se procedió a la búsqueda de posibles asociaciones estadísticas entre los distintos hallazgos genéticos, clínicos y demográficos tenidos en cuenta, así como a la evaluación de curvas de supervivencia mediante estudios Kaplan-Meier, con el fin de diferenciar subgrupos de riesgo metastásico que permitiesen identificar a los pacientes de mayor riesgo. Los resultados obtenidos fueron comparados con otros estudios pioneros en el campo y con los más actuales para explorar la validez de esta nueva metodología y la posibilidad de su incorporación a la rutina clínica de la unidad.

Mediante este trabajo, se incrementó, por tanto, el esfuerzo de la comunidad científica por seguir avanzando en el conocimiento de las bases genéticas del MU y el comportamiento de los tumores en base a una parte conocida de la variación genética. Además, el aquí presentado, constituye el primer estudio de secuenciación masiva aplicada al MU en una cohorte de pacientes española, publicado hasta la fecha.

C3. 5.1 DISEÑO DEL PANEL DE GENES Y MÉTRICAS DE CALIDAD DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA

El objetivo de esta investigación, consistió en la evaluación de la utilidad clínica de un panel de genes específicamente diseñado para la elaboración de un perfil molecular más detallado de cada MU, incluyendo la detección de mutaciones somáticas. En el panel se incluyeron los seis principales genes asociados a MU hasta la fecha (*GNAQ*, *GNA11*, *PLCB4*, *SF3B1*, *EIF1AX*, *BAP1*)[155] y los genes *BRAF*

y *LZTS1*. El gen *BRAF* se incluyó para destacar la presencia de mutaciones en el MU y confirmar una parte de las diferencias genéticas previamente descritas entre el MU y el MMC[30,226]. En el caso del gen *LZTS1*, su inclusión en el panel diseñado supone una diferencia con estudios similares recientemente publicados[386,387]. Como mencionamos en apartados anteriores de esta tesis doctoral, alteraciones en el patrón de expresión de este gen se han asociado con MU que metastatiza rápidamente[313], pero el papel de las mutaciones puntuales ha sido escasamente estudiado en relación al pronóstico del MU.

Muchos de los estudios de secuenciación en MU llevados a cabo hasta la fecha, se basan en estrategias clásicas como la secuenciación Sanger[384,452], que aunque válidas, presentan limitaciones especialmente en cuanto a la cantidad de ADN necesaria para llevar a cabo los ensayos y a la sensibilidad analítica. La secuenciación de exomas dirigidos o exomas completos permitiría satisfacer esta necesidad y mejorar las limitaciones inherentes a la secuenciación Sanger, sin embargo, la baja carga mutacional descrita en el MU concentrada en un pequeño número de genes[155], hace que no sea necesario recurrir a este tipo de estrategias, resultando los paneles de genes más coste-efectivos y reduciendo la cantidad de información genética innecesaria y de difícil interpretación que se obtendría en el caso de un exoma. Por tanto, nuestro diseño respondió a la necesidad de una estrategia que permitiese la secuenciación conjunta de los genes de interés en un único procedimiento y con una cantidad de ADN tumoral reducida.

El hecho de ser capaces de llevar a cabo una estrategia de secuenciación con cantidades reducidas de ADN (5-20 ng totales), resulta de vital importancia en el caso del MU, ya que permite la evaluación de muestras que proceden de biopsias por aspiración con aguja fina (BAAF) cuya fracción de muestra tumoral suele ser reducida. De hecho, en este estudio se posibilitó el análisis de tres muestras que, debido a su escasez en origen, no habían podido ser clasificadas en cuanto a riesgo en base a la técnica MLPA. Estas cantidades de ADN son similares a las descritas por otros grupos como Smit et al. y Thornton et al., donde se parte de concentraciones de 10 ng y 5-25 ng, respectivamente[386,387]. En el estudio publicado recientemente por Thornton et al., se describe la secuenciación exitosa de ADN

procedente de muestras parafinadas y, por primera vez, muestras derivadas de tumores irradiados[387]. En nuestro trabajo, se secuenciaron con éxito, aunque con un objetivo distinto, dos muestras de ADN extraídas de muestras tumorales parafinadas de MU. Por lo que pudimos confirmar la validez del diseño para la secuenciación de este tipo de muestras. Así, este panel de genes posibilitaría el estudio retrospectivo de muestras parafinadas de MU obtenidos por enucleación. La secuenciación de muestras procedentes de tumores parafinados, fue posible gracias al tamaño de los amplicones elegido en el diseño (125-175 bp), que permitió el análisis de muestras de ADN potencialmente fragmentadas.

En cuanto a la cobertura y profundidad de lectura media obtenida para las muestras evaluadas, cabe resaltar que se encuentra en línea con los mínimos requerimientos para la validación de un panel de genes con fines clínicos[453]. Ya que se logró un porcentaje de cobertura media con una profundidad de lectura mínima de 30x calculada sobre las regiones diana, exones y regiones intrónicas flanqueantes (±10 bp) del 92% y una profundidad de lectura media de 7480x, para las muestras analizadas. Para el análisis, el valor umbral de la VAF se situó en un 5%, lo cual nos permitió la identificación de mutaciones recurrentes conocidas en muestras con concentraciones muy oscilantes de ADN y en ocasiones con una probable población celular tumoral reducida. Habitualmente, la VAF umbral empleada en los estudios de secuenciación se sitúa en el 10%, aunque varias guías de recomendación para validación de paneles de genes para oncología clínica, sugieren tomar el 5% como valor umbral cuando se trate de mutaciones recurrentes e incluso, no descartar de entrada valores inferiores al 5% cuando se trate de mutaciones accionables a nivel terapéutico[398,453]. Aunque, en este último caso, se recomienda la validación de las mismas en un nuevo ensayo con muestra procedente de una fracción tumoral distinta del tumor en estudio.

C3. 5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y RIESGO DE METÁSTASIS

Para el presente estudio, se seleccionaron un total de 46 muestras de ADN tumoral procedente de fracciones de MU primario obtenidos en la URQTIA por enucleación, endorresección o BAAF. Se llevó a cabo una evaluación pronóstica en base a caracteres clínicos, demográficos y fundamentalmente genéticos de una cohorte de 46 pacientes que habían sido previamente clasificados en grupos de riesgo genético mediante el estudio de MLPA. La selección de las muestras se basó únicamente en la disponibilidad de ADN tumoral hasta la fecha del diseño, tras haber sido sometidas al test genético rutinario mediante la técnica MLPA.

En este grupo de pacientes, se evaluó la asociación de ciertas características clínicas y demográficas con el riesgo de desarrollo de metástasis y sólo observamos una diferencia estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes y la aparición de enfermedad metastásica (p-valor = 0,019). Este dato resultó contradictorio con lo observado en el estudio exclusivo de alteraciones cromosómicas en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, donde se valoró un tamaño muestral mayor. Sin embargo, en esta cohorte, no se detectaron diferencias significativas para otras características que se han asociado con un riesgo incrementado de metástasis en la literatura como la presencia de células epiteliales, el tamaño tumoral o la localización intraocular del tumor[144,357]. Dichas discrepancias podrían ser debidas al tamaño muestral y al tiempo de seguimiento reducido, ya que en los 89 pacientes estudiados en el trabajo presentado en el capítulo 2, sí vimos diferencias significativas para el tamaño tumoral.

C3. 5.3 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN EL MU: FRECUENCIA Y ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD METASTÁSICA

Como se comentó en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, el MLPA se seleccionó por las ventajas y aplicaciones en la rutina clínica[334,357].

En el trabajo descrito en este capítulo, se emplearon los datos ya disponibles obtenidos mediante la técnica de MLPA para llevar a cabo una clasificación, fundamentalmente, en cuanto a número de copia del cromosoma 3 y se designaron inicialmente dos grandes grupos de

riesgo; el grupo de bajo riesgo (MU-D3) y el grupo de alto riesgo (MU-M3). Aunque el estudio de las alteraciones cromosómicas no fue el objetivo principal de este trabajo, puesto que ya lo fue en el capítulo anterior, resultó necesario llevar a cabo un breve análisis de las alteraciones cromosómicas de las 46 muestras para poder establecer perfiles moleculares más exhaustivos al incluir el perfil mutacional somático.

A este respecto, cabe mencionar que, a pesar de que hemos detectado ciertas diferencias en cuanto a las asociaciones estadísticas respecto a otros trabajos, la prevalencia de las alteraciones cromosómicas detectadas se mantuvo en línea con estudios similares publicados[357,361,374]. De los 46 pacientes estudiados, aproximadamente la mitad se distribuían entre los grupos de alto y bajo riesgo, identificándose 22 (48%) pacientes de alto riesgo y 21 pacientes (46%) de bajo riesgo con MU-D3[151]. En los estudios de supervivencia corroboramos que los pacientes de alto riesgo (MU-M3), presentaban una supervivencia libre de metástasis menor que los de bajo riesgo (Log-rank, p-valor = 0,0097), un resultado similar al típicamente descrito[357,361] y al observado en el trabajo presentado en el capítulo 2.

La determinación de una clasificación binaria de los MU según el riesgo, es contraria a los resultados obtenidos por otros grupos y al obtenido en la cohorte total de 89 pacientes estudiados por MLPA en el capítulo 2, donde las pérdidas en 1p, 6q y 8p y las ganancias en el cromosoma 8q, sí parecían aportar un riesgo incrementado de metástasis y *por ende*, rompían con el modelo binario de estratificación[347,357,362,380]. Sin embargo, en los 46 pacientes incluidos en este trabajo, a pesar de que se detectó una prevalencia mayor de ganancias en 8q en los casos que desarrollaron metástasis, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (p-valor=0,10). Tampoco se observaron diferencias entre las curvas de supervivencia de los pacientes que presentaban ganancias en esta región cromosómica en los distintos grupos (D3-con 8q normal/D3-con ganancia 8q/M3-con 8q normal/M3-con ganancia en 8q) (Log-rank, p-valor = 0,11).

En algunos trabajos como el publicado por Caines et al., se describe una reducción significativa en la supervivencia de los pacientes que presentan MU con M3 acompañado de ganancia en 8q y, por ello distinguen tres subgrupos de riesgo (MU-D3, MU-M3 y MU-M3+8q). Sin embargo, estos mismos autores observan que en su estudio, es realmente la M3 la que parece aportar el riesgo de metástasis y que, aunque las ganancias en 8q parecen acelerar el proceso, por sí solas, no muestran un riesgo mayor. En nuestro caso, las discrepancias parecen deberse más bien al tamaño muestral valorado y a un tiempo de seguimiento reducido de los pacientes, ya que observamos que bajo un tamaño muestral mayor (n=89) y con un mayor tiempo de seguimiento, las ganancias en 8q sí cobran significancia a nivel de supervivencia.

Respecto al resto de alteraciones cromosómicas identificadas en esta cohorte, se vio que existía una mayor prevalencia de pérdidas en el cromosoma 6q en los pacientes con metástasis en comparación con los pacientes que no desarrollaron metástasis en el transcurso de este estudio y esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa (p-valor = 0,001)[292]. Por el contrario, las ganancias en el cromosoma 6p, que se han asociado típicamente con un efecto protector frente a metástasis[162,334,357], no mostraron una asociación significativa con la ausencia de metástasis, un resultado que también observamos estudiando un número mayor de pacientes en el capítulo 2.

C3. 5.4 FRECUENCIA DE MUTACIONES SOMÁTICAS; ASOCIACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y SUPERVIVENCIA

Estudios recientes han demostrado que el MU a diferencia de otros como el MMC, presenta una carga mutacional muy reducida[155]. De hecho, ambos tipos de neoplasias se encuentran, a pesar de compartir un origen embrionario común[31], muy alejados en cuanto a esta característica. Por un lado, el MMC presenta una de las tasas de mutaciones más elevadas de todas las neoplasias conocidas[454], con una densidad media de mutaciones situada en torno a 18 por Mb[155]. Mientras que, en el caso del MU, la densidad media de mutaciones se sitúa próxima a 1,1 por Mb y además se concentra en un número limitado de genes[155]. Se cree que esta baja carga mutacional, podría ser la responsable de la baja eficacia de ciertas inmunoterapias en el MU

en comparación con otros tipos de melanomas, ya que una carga mutacional elevada se correlaciona con un amplio repertorio de neoantígenos, lo cual a su vez se asocia con una mejor respuesta frente al tratamiento[175,455]. Otra diferencia que se ha apreciado en los estudios de secuenciación masiva en el MU respecto al MMC, es que el primero no presenta la firma mutacional típicamente asociada a la exposición a la radiación UV[399], dejando patente que el desarrollo y progresión de este tipo de tumores poco tiene que ver con esta condición ambiental.

En este estudio, todas las muestras a excepción de 2 (4%), presentaron mutaciones en alguno o varios de los genes incluidos en el panel. De las muestras que no revelaron mutaciones, una de ellas mostró ganancia del cromosoma 6p por MLPA, alteración que sí aparece de manera recurrente en el MU y que, por tanto, nos permitió confirmar genéticamente este diagnóstico. En el caso de la otra muestra, a pesar de tratarse de ADN extraído a partir de fragmento tumoral tras enucleación, no se detectó la presencia de ninguna alteración cromosómica ni tampoco de ninguna mutación en los genes incluidos en el panel. En este caso, podríamos encontrarnos ante un tumor con una elevada heterogeneidad tumoral que actuase enmascarando la presencia de alteraciones cromosómicas y/o mutaciones somáticas, o bien que el tumor no presentase, verdaderamente, ninguna de las alteraciones estudiadas. Este último hecho parece ser muy poco frecuente en el MU, pues, mayoritariamente estos tumores están caracterizados por la presencia de mutaciones en alguno de los cuatro genes descritos como conductores oncogénicos[70,399,416,420].

C3. 5.4.1 Mutaciones iniciadoras

En el MU, se ha descrito la presencia de mutaciones *driver* implicadas tanto en la oncogénesis, como en su progresión y pronóstico. En el caso de las primeras, las que implican a los genes *GNAQ* y *GNA11,* son las más comúnmente descritas en la mayor parte de las cohortes de MU estudiadas, alcanzando tasas de prevalencia cercanas al 85-90%[70,155,416]. En este estudio encontramos que, el 87% de las muestras secuenciadas presentó alguna de las mutaciones típicamente descritas para uno de estos dos genes siguiendo un patrón mutuamente excluyente (52,2% de mutaciones en *GNAQ* y 34,8% en *GNA11*). La

tasa de prevalencia detectada para estas mutaciones mostró un valor muy próximo a los descritos en la bibliografía en estudios que siguen metodologías de distinta índole[70,162,386,387,416,456]. Aunque en dos trabajos distintos llevados a cabo en población griega[457] y población china[458], la frecuencia para estas mutaciones se situó en 42% y 38%, respectivamente. Ambas frecuencias son muy inferiores a los valores habitualmente descritos, sin embargo, a día de hoy, no se ha sugerido la posibilidad de que exista una variación interpoblacional a este respecto. Por lo que, en su defecto, las variaciones podrían deberse a que en ambos casos se empleó la tecnología de secuenciación Sanger que, ofrece una menor sensibilidad.

Del total de muestras analizadas, un pequeño porcentaje (13%) no mostró mutaciones en *GNAQ* o *GNA11*. Este dato, al igual que la presencia de mutaciones en otros genes como *PLCB4*[399] o *CYSLTR2*[420], que posibilitan el mantenimiento activo de la vía de señalización MAPK necesaria para el desarrollo de la mayor parte de los MU[412], ya había sido descrito. De las seis muestras que no presentaron mutaciones en *GNAQ* o *GNA11* en esta cohorte, ninguna mostró mutaciones para el *hotspot* mutacional (p.Leu129Gln) localizado en el gen *CYSLTR2*, a pesar de que en algunos trabajos se sugiere una prevalencia de mutaciones para el mismo cercana al 4%[155,420]. En este trabajo, el *hotspot* mutacional del gen *CYSLTR2* se secuenció mediante la metodología Sanger, ya que no fue inicialmente incluido en el diseño del panel[386,459]. La ausencia de mutaciones para el mismo, también fue descrita en otras cohortes de pacientes bajo el empleo de una metodología similar[384]. Por lo que no puede descartarse con total seguridad que la menor sensibilidad de la técnica empleada pueda estar enmascarando dicha mutación en alguna muestra.

Por otro lado, en el caso del gen *PLCB4*, un efector *downstream* del gen *GNAQ*, se ha descrito una tasa de prevalencia de mutaciones de aproximadamente un 2,5% en el MU[155,399]. En nuestro estudio, dos muestras presentaron mutaciones en el *hotspot* mutacional descrito para este gen (p.D630), frecuencia ligeramente superior a la habitualmente publicada. Además, cabe mencionar que, aunque en la literatura se describió la relación excluyente entre la presencia de mutaciones en este gen y los otros genes con función de conductor oncogénico, uno de los

pacientes mostró coexistencia con la mutación p.R183Q del gen *GNAQ*. Un hallazgo similar fue descrito por Thornton et al. en su reciente publicación, sin embargo, estos autores describieron la coexistencia, en dos pacientes distintos, de la mutación p.R183Q en *GNAQ* con dos nuevas mutaciones truncantes localizadas en el exón 18 de *PLCB4*[387].

En nuestro estudio, detectamos variantes adicionales en el gen *PLCB4* en 7 muestras más. Estas variantes se hallaron, mayoritariamente, en coexistencia con mutaciones en *GNAQ* o *GNA11* y ninguna de ellas había sido previamente descrita en la base de datos COSMIC en relación a MU o a otros tipos de cáncer. En todos los casos, fueron de tipo *missense* y en su mayoría, el análisis mediante las herramientas de predicción *in silico*, determinó que podrían tener un efecto potencialmente patogénico sobre la proteína codificada por este gen. Recientemente, F. Piaggio et al.[460], postularon que el papel desempeñado por *PLCB4* en la oncogénesis del MU coincidiría más con el de un gen *driver secundario* dada la coocurrencia de mutaciones en el mismo y en los genes *GNAQ* o *GNA11* en un mismo MU. Sin embargo, mutaciones en *PLCB4* se han descrito como cruciales en el desarrollo de melanocitosis, un conocido factor de riesgo para el MU[461], lo cual apoyaría su papel como *driver primario* en la oncogénesis de estos tumores.

La presencia de mutaciones con función iniciadora en *GNAQ*, *GNA11*, *PLCB4* y *CYSLTR2*, ha sido descrita en todos los estadios de desarrollo del MU, incluso en las etapas más tempranas y en nevus benignos, por lo que parece claro que su implicación supone un evento temprano y crucial en el desarrollo del MU[416,417,420,462]. Además, en la mayor parte de los estudios publicados, se vio que su presencia no muestra una preferencia por una subclase concreta de MU, por lo que se descartó su implicación en la transición hacia una enfermedad metastásica y se consideró que únicamente están implicados en el proceso de carcinogénesis[155]. Este efecto se pudo corroborar también en nuestro estudio, donde no observamos diferencias significativas para la prevalencia de mutaciones en *GNAQ*, *GNA11* y *PLCB4* entre los pacientes con y sin metástasis o en tumores con D3 o M3. Lo mismo ocurrió cuando evaluamos las diferencias en cuanto a las curvas de supervivencia entre pacientes con y sin mutaciones en dichos genes,

indicando una nula o muy baja implicación de los mismos en el pronóstico del MU.

C3. 5.4.2 Mutaciones con valor pronóstico

La segunda categoría de mutaciones identificadas en el MU, confieren valor pronóstico y hasta la fecha, se focalizan en tres genes recurrentemente mutados; *BAP1*, *SF3B1* y *EIF1AX*[155]. En contraste a lo que ocurría con las mutaciones iniciadoras, las que implican a estos genes sí parecen asociarse a evoluciones pronósticas marcadamente diferentes de la enfermedad y, por ello, suelen mostrar un patrón mutuamente excluyente[149,151,152,385]. Las mutaciones en *BAP1* y *SF3B1*, se han asociado a un riesgo metastásico elevado e intermedio, respectivamente[149,151]. Mientras que en el caso del gen *EIF1AX*, se ha descrito su asociación a buen pronóstico de la enfermedad[152,385]. De hecho, en nuestra cohorte comprobamos que las mutaciones detectadas en estos genes, seguían un patrón mayoritariamente excluyente. Por el contrario, en su reciente estudio, Thornton et al. describieron al menos dos casos que mostraban coexistencia de mutaciones en *SF3B1* y *EIF1AX* y otros 3 donde se detectó una mutación en *SF3B1* y otra en *BAP1* de manera simultánea y que, además, 4 de estos 5 pacientes acabaron desarrollando metástasis[387].

C3. 5.4.2.1 Estudio mutacional del gen *BAP1*

La frecuencia de mutaciones en el gen *BAP1* se situó en este estudio en un total del 33%, ocurriendo en su mayoría en el grupo de tumores que presentaban M3 (81,3%; p-valor<0,002). Estos resultados son consistentes con los descritos en otras publicaciones[149,155,386,387]. De hecho, en el proyecto TCGA en MU, donde se analizaron un total de 80 muestras de MU primario, se vio que aproximadamente un 83,3% de los MU-M3 presentaban mutaciones en *BAP1*[155]. Del mismo modo, mediante secuenciación Sanger, Harbour et al.[149], publicaron una tasa de prevalencia de mutaciones en *BAP1* del 81,5% en tumores con M3. En la mayor parte de estos trabajos, la presencia de mutaciones en *BAP1* se asocia con un mal pronóstico en MU[149,155]. Sin embargo, Thornton et al. describieron que en su último estudio la presencia de mutaciones en *BAP1* en tumores con M3 no se correlacionaba con una menor

supervivencia de los pacientes y lo justificaron en base a la posibilidad de que el estado mutacional del gen no siempre es correlativo a una ausencia de expresión de la proteína[387]. Por el contrario, otros autores describieron una correlación muy elevada entre el estado mutacional de *BAP1* y la ausencia de expresión de la proteína, independientemente del tipo de mutación detectada[324,386,438]. De hecho, Smit et al. afirmaron que en aproximadamente el 91,6% de las muestras analizadas, las mutaciones detectadas en *BAP1* se corresponden con una pérdida de expresión de la proteína[386]. En nuestro estudio, no se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de la proteína BAP-1. No obstante, a pesar de que el tiempo de seguimiento de los pacientes fue reducido en comparación a otros trabajos, sí se observó una elevada correlación entre el desarrollo de metástasis en los pacientes que presentaron tumores con M3 y mutaciones en *BAP1* (p-valor = 0,001). Asimismo, vimos que existía una reducción en la supervivencia libre de metástasis en aquellos pacientes con mutaciones en el gen *BAP1* (Log-rank, p-valor = 0,022). Por lo que en nuestro caso, a diferencia de Thornton et al.[387] y de acuerdo con otros estudios[149,386], sí se pudo confirmar una asociación significativa entre el estado mutacional del gen *BAP1* y el riesgo incrementado de metástasis.

Con respecto al tipo de mutaciones identificadas en *BAP1* en este trabajo, la mayor parte fueron de tipo truncante y habían sido descritas en la base de datos COSMIC en relación a MU o a otros tipos de cáncer incluidos en el espectro fenotípico del síndrome de predisposición a tumores asociado a *BAP1*[463]. Este resultado es similar al de estudios pioneros de secuenciación para el gen *BAP1* en MU primario, donde ya se había confirmado una detección mayoritaria de mutaciones con efecto inactivante de la proteína[149].

El gen *BAP1* se comporta como un supresor de tumores y está implicado en la integridad del genoma a múltiples niveles. Por ello, se ha visto que la presencia de mutaciones somáticas con efecto inactivante, actúa como un segundo *hit* mutacional para la progresión de la enfermedad y el desarrollo de metástasis[149]. Este tipo de mutaciones, que conllevan mayoritariamente la aparición de un codón de parada prematuro, pueden, por un lado, llevar a la síntesis de ARNm anormales que acaban siendo sometidos al mecanismo de defensa de

degradación de ARNm mediado por mutaciones terminadoras[464] o en su defecto, dar lugar al origen de proteínas truncandas que carezcan de la región C-terminal[212]. En cualquier caso, el efecto final acaba siendo una ausencia de expresión de la proteína o la expresión de una proteína no funcional. En algunos estudios también se ha descrito una falta de expresión de la proteína en ausencia de mutaciones en el gen *BAP1*[149,151], pero hasta la fecha no se ha demostrado que la ausencia de expresividad de *BAP1* pueda estar asociada a otros mecanismos molecular que no sean la presencia de variantes deletéreas, lo cual sugiere que o bien las técnicas empleadas en esos estudios no detectaron la totalidad de mutaciones en *BAP1* o la existencia de mecanismos epigenéticos reguladores.

Por otro lado, aunque menos comunes y con efectos menos conocidos, las variantes de tipo *missense* también han sido descritas en el gen *BAP1* en MU primario. En concreto, en nuestro trabajo se detectaron dos variantes de este tipo. Ninguna de ellas había sido descrita previamente en relación a MU, aunque sí constaban como probablemente patogénicas en relación a otros tipos de cáncer en la base de datos COSMIC. Como se ha indicado con anterioridad, las variantes *missense* afectan, generalmente, al dominio catalítico UCH con función desubiquitinasa y podrían llevar a una inactivación del mismo manteniendo la expresión y localización nuclear de la proteína o incluso a su desestabilización[223]. En esta cohorte, las dos variantes *missense* detectadas (p.E125D y p.G185R) se ubicaron en exones que implican al dominio UCH de la proteína. Aunque no se llevaron a cabo estudios funcionales para determinar el posible efecto deletéreo de las mismas, en el caso de la primera, las predicciones *in silico* indicaron patogenicidad y, además, había sido clasificada como patogénica en la base de datos COSMIC en relación a otros tipos de cáncer. Mientras que, para la segunda, las predicciones *in silico* resultaron contradictorias y a pesar de que estaba descrita como probablemente patogénica en COSMIC en relación a otro cáncer, fue considerada de significado incierto-probablemente patogénica en el MU.

Cabe mencionar, que los dos pacientes con variantes *missense* en *BAP1* desarrollaron metástasis. Uno de ellos había sido incluido ya en el grupo de alto riesgo por presentar M3, mientras que el otro se

clasificó inicialmente en el grupo de bajo riesgo (MU-D3). El análisis en conjunto de los resultados obtenidos mediante MLPA y el panel de genes, hizo que nos planteásemos que este paciente podría mostrar una isodisomía del cromosoma 3, basándonos en que las mutaciones en *BAP1* suelen ir asociadas a M3 y no a D3, así como en la mala evolución clínica del paciente. A ambos factores hubo que añadir que, la frecuencia alélica de la variante (VAF) detectada era muy elevada (85%) en comparación a la que cabría esperar para una mutación somática en heterocigosis (50%) si el paciente presentase dos copias de origen distinto del cromosoma 3. En la bibliografía se ha sugerido que cuando una VAF es mayor de lo que se espera, puede sospecharse de dos situaciones; que se trate de una mutación germinal o que exista una pérdida de heterocigosidad para la región cromosómica donde se encuentra el gen[453]. En el caso de este paciente, se descartó pérdida de heterocigosidad por M3, motivo que hizo sospechar de la existencia de dos copias idénticas del cromosoma 3 donde el gen *BAP1* portase la mutación identificada y que, por tanto, supusiese una VAF muy próxima a la que cabría esperar si la mutación se encontrase en homocigosis adquirida.

Como vimos en el capítulo 2, Onken et al. observaron una reducción en la supervivencia libre de metástasis en pacientes con MU con isodisomía 3 similar a la observada en los casos con M3[354]. Así, la posible presencia de isodisomía 3 en el paciente aquí estudiado, podría explicar más fehacientemente la mala evolución clínica del mismo. Pero como se describió en el capítulo anterior, este paciente mostró otras alteraciones cromosómicas también asociadas con un incremento en el riesgo de metástasis y, debido a la ausencia de muestra de ADN germinal por tratarse de un estudio retrospectivo, no pudo descartarse que la mutación detectada en *BAP1* fuese de origen germinal.

C3. 5.4.2.2 Estudio mutacional de los genes *SF3B1* y *EIF1AX*

La frecuencia de mutaciones en el *hotspot* del gen *SF3B1* en el MU primario oscila en la literatura entre un 11% y un 24%, aproximadamente[385-387,422]. En nuestro estudio, se vio que las mutaciones en este gen ocurrían en 22% de las muestras, tasa de prevalencia situada dentro de este intervalo y muy próxima a otras

recientemente publicadas[387].

Habitualmente, las mutaciones en *SF3B1* se han descrito en MU con D3, tumores asociados, *a priori*, con un bajo riesgo de metástasis. Sin embargo, en estudios relativamente recientes donde se tuvieron en cuenta tiempos prolongados de seguimiento (hasta 20 años), se vio que existía una asociación entre la presencia de estas mutaciones y el desarrollo tardío de metástasis[151]. En nuestra cohorte, para evaluar el valor pronóstico asociado a las mutaciones en *SF3B1* de una manera independiente al efecto pronóstico intrínseco a la M3, estudiamos la supervivencia de pacientes con D3 y *SF3B1* mutado o sin mutar, pero no observamos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Por ello, coincidiendo con trabajos similares[152,443], consideramos que es posible que, a medida que se incremente el tiempo de seguimiento de los pacientes, los resultados puedan cobrar significación y podría observarse, también en esta cohorte, el efecto pronóstico asociado a las mutaciones en *SF3B1*. De hecho, tras la publicación de nuestro estudio, hemos podido comprobar que, al menos uno de los pacientes con *SF3B1* mutado, desarrolló metástasis.

En el caso del gen *EIF1AX*, las mutaciones para el mismo en el MU fueron detectadas por primera vez en un estudio publicado por Martin et al. en el año 2013, en MU-D3[385]. La presencia de mutaciones en este gen se ha asociado con un buen pronóstico en MU, aunque excepcionalmente se ha descrito su presencia en tumores con M3[152,385,387]. En nuestro estudio, la tasa mutacional en *EIF1AX* (15%) fue muy similar a la descrita por otros grupos[155,399] y además, se observó un patrón excluyente respecto a mutaciones en *BAP1* y *SF3B1*[385]. De hecho, sólo una de las muestras que presentaron mutaciones en *EIF1AX* mostró una variante en el gen *BAP1* clasificada como neutral en la base de datos COSMIC.

En su mayoría, las mutaciones en *EIF1AX* se detectaron en MU con D3, pero en dos muestras se observó coexistencia con M3. Este último acontecimiento es poco común y, a día de hoy, no se conoce con exactitud el efecto de esta combinación. No obstante, es probable que un aumento en el tiempo de seguimiento de los pacientes permita esclarecer el efecto pronóstico de esta asociación.

Cabe mencionar, que ninguno de los pacientes con *EIF1AX* mutado desarrolló metástasis a lo largo de nuestro estudio. Sin embargo, los análisis de asociación entre la presencia de mutaciones en este gen y ausencia de metástasis, no resultaron significativos ni tampoco observamos diferencias en la supervivencia de pacientes con *EIF1AX* mutado y sin mutar. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por otros grupos, donde sí se evidenció una clara asociación entre las mutaciones en *EIF1AX* y el buen pronóstico de la enfermedad[151,152,385]. Esta discrepancia podría deberse, nuevamente, al escaso tiempo de seguimiento de los pacientes.

A nuestro parecer, los resultados obtenidos para los genes *SF3B1* y *EIF1AX*, al igual que ocurrió en otros estudios[152,443], evidencian la importancia de valorar tiempos de seguimiento amplios en los estudios con fines pronóstico en el MU. Asimismo, ponen en manifiesto la necesidad de llevar a cabo una evaluación clínica constante y periódica de los pacientes con posible riesgo de metástasis, ya que, aparentemente, un tumor con pocas probabilidades de metastatizar debido a su naturaleza genética (por ejemplo, si presenta D3 y ausencia de mutaciones en *BAP1*), puede acabar haciéndolo con el paso del tiempo debido a otros factores genéticos que así lo favorecen, como la presencia de mutaciones en *SF3B1*.

C3. 5.4.3 Secuenciación del gen *LZTS1*

Una de las novedades de este trabajo fue la incorporación del gen *LZTS1* a un estudio de NGS en el MU. En nuestro diseño se incorporó toda la región codificante del gen y regiones intrónicas flanqueantes (±10 pb). La decisión de su inclusión en el panel de genes, derivó de la detección de una variante a nivel germinal en uno de los pacientes con MUB que acabó desarrollando metástasis estudiados en el capítulo 1.

Como vimos, la posible relevancia del gen *LZTS1* en el MU fue descrita por Onken et al., quienes propusieron que actuaba como un regulador metastásico en estos tumores[313]. Las investigaciones con este gen, surgieron de la necesidad de buscar un locus concreto que pudiese explicar el riesgo incrementado de metástasis detectado en algunos MU con pérdida para 8p. Sin embargo, a juzgar por los resultados que hemos obtenido, las mutaciones puntuales en *LZTS1*, parecen no jugar un papel

importante en el pronóstico del MU.

Sólo dos de las muestras estudiadas presentaron variantes en este gen, siendo ambas de significado incierto. Una de las variantes, (p.Ser9Cys), fue detectada en un MU que sólo presentó M3 y en el cual no se detectaron otras mutaciones en los genes con valor pronóstico estudiados. La frecuencia alélica de esta variante fue próxima al 90%, por lo que podría tratarse de una variante con naturaleza germinal en el paciente. La segunda variante, localizada en una región reguladora del gen, se detectó en un MU con D3 que además presentó una mutación en el gen *EIF1AX*. Ninguno de los dos pacientes con variantes en *LZTS1*, desarrolló metástasis a lo largo del estudio, por lo que no se detectó asociación significativa entre la presencia de variantes en *LZTS1* y el riesgo de metástasis.

En el trabajo publicado por Onken et al., se secuenciaron siete tumores pertenecientes a la clase 2B con muy alto riesgo de metástasis, y ninguno mostró la presencia de mutaciones en *LZTS1*. Por ello, propusieron que su habilidad para actuar como modificador metastásico en el MU derivaba de su silenciamiento por pérdida de una de sus copias y posible inactivación por hipermetilación de la otra[313]. Así, de acuerdo a nuestros resultados y a los previamente publicados por estos autores, es probable que las mutaciones puntuales en *LZTS1* no interfieran en el pronóstico del MU y que sólo otras alteraciones que provocan cambios en los niveles de expresión de la proteína le confieran valor como regulador metastásico.

C3. 5.4.4 Secuenciación del gen *BRAF*

En el diseño de este panel de genes para MU, se incluyeron amplicones para el *hotspot* mutacional (p.V600) localizado en el exón 15 del gen *BRAF*, un oncogén que forma parte de la vía de señalización intracelular MAPK. Hoy en día, se sabe que las mutaciones en este gen son las más prevalentes en el MMC. Sin embargo, en el MU, la ausencia o escasez de mutaciones en *BRAF*, motiva una de las principales diferencias a nivel molecular entre ambos tipos de melanomas[100].

En nuestro estudio, tal y como cabría esperar, no se detectó ninguna mutación en el *hotspot* mutacional de este gen, hallazgo que nos permitió confirmar un proceso de tumorogénesis distinto para los

melanocitos entre ambos tipos de neoplasias. Al igual que en nuestro diseño, en otros trabajos recientemente publicados se incluyó la secuenciación de este *hotspot* mutacional como control negativo, no detectándose, tampoco, mutaciones en ninguna de las muestras secuenciadas[387].

C3. 5.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente estudio cuenta con algunas limitaciones que han de ser mencionadas. Una de las principales radica en que, debido a su naturaleza fundamentalmente retrospectiva, en la mayor parte de los pacientes no se disponía de muestra de ADN germinal, por lo que no pudo comprobarse en todos los casos el origen somático de las mutaciones identificadas para cada tumor. Esto último, sería importante especialmente en el caso de las mutaciones localizadas en el gen supresor de tumores *BAP1* de cara a poder ofrecer un adecuado asesoramiento genético al paciente y su familia.

Por otro lado, en el diseño del panel no se incluyó el *hotspot* mutacional del gen *CYSLTR2* que, a pesar de representar una pequeña proporción del espectro mutacional, se ha descrito como recurrentemente mutado en el MU. La primera investigación que describe la existencia de un *hotspot* mutacional en *CYSLTR2* en MU se publicó en el año 2016[420], por lo que no incluirlo en su momento resultó un error. Por consiguiente, y de cara a la publicación de este trabajo, se procedió a la secuenciación directa mediante Sanger de este *hotspot* con el objetivo de completar el estudio. Sin embargo, aunque la secuenciación Sanger continúa siendo utilizada en la rutina diaria de cualquier laboratorio de genómica con diferentes propósitos, su sensibilidad es mucho menor, especialmente cuando se pretende detectar mutaciones de origen somático. Por ello, consideramos que la incorporación de este gen al diseño, sería necesaria en futuros procedimientos.

No obstante, esta limitación es fácilmente subsanable, ya que una de las ventajas que ofrecen los paneles de genes, es que su diseño puede ser fácilmente actualizado a medida que nuevos genes van siendo descubiertos en relación a una patología concreta. Además, sería ideal diseñar una estrategia de secuenciación en la que se posibilite el análisis

simultáneo de mutaciones puntuales en los genes de interés y la presencia de alteraciones en los cromosomas 1p, 3, 6 y 8. Muy recientemente dos grupos independientes; Smit et al.[386] y Thornton et al.[387], publicaron una aproximación similar. En ambos estudios, se partió de un diseño específico de NGS para MU, en el que se añadieron sondas para polimorfismos localizados en los cromosomas de interés, pudiendo detectar regiones con alteraciones en el número de copias, con una mayor tasa de eficacia que en el MLPA.

Ser capaces de detectar ambos tipos de alteraciones genéticas en un solo procedimiento resulta de gran utilidad, ya que, simplifica las labores asistenciales en laboratorios con una amplia demanda en su rutina diaria, pudiendo obtener en un solo análisis un resultado informativo completo del perfil genético de cada MU. Además, el rendimiento diagnóstico obtenido es mayor, permitiendo reducir el número de falsos negativos que pueden derivar de un estudio de MLPA, que ofrece una representación menos homogénea y más incompleta de las regiones cromosómicas. Otra ventaja radica en que la cantidad de muestra de partida necesaria para llevar a cabo estos estudios es reducida, por lo que en casos en los cuales la cantidad de ADN tumoral fuese muy baja, se posibilitaría una buena clasificación pronóstica de todos los pacientes.

Al igual que en nuestro estudio, en varios de los paneles de NGS diseñados por otros grupos para el estudio del MU[386,387], se incluyó el análisis de ADN tumoral obtenido a partir de muestras parafinadas, lo cual presenta una gran utilidad, ya que en la práctica clínica diaria, a veces la disponibilidad de tejido fresco es limitada, especialmente en el caso de que quieran llevarse a cabo estudios retrospectivos. Pero, además, Thornton et al. incluyeron, por primera vez, el estudio de muestras irradiadas, lo cual puede ser de gran utilidad desde el punto de vista de seguimiento de los pacientes a lo largo del tratamiento. Ya que, permitiría establecer comparaciones de los resultados obtenidos en las muestras pre- y postratamiento y ver cuál es la evolución clínica del tumor y su respuesta frente al tratamiento.

En definitiva, es importante resaltar la posible traslación clínica del diseño de este panel, que es de utilidad no sólo para la caracterización molecular de MU primarios, sino también para el manejo de muestras

parafinadas, posibilitando la ejecución de estudios retrospectivos. Sería recomendable la incorporación de amplicones para los genes no incluidos en esta fase del estudio, así como redirigir el diseño para poder analizar en un mismo ensayo la presencia de alteraciones cromosómicas con valor pronóstico en el MU. Además, podría ser testado en muestras irradiadas con el fin de comprobar la respuesta de los melanomas frente al tratamiento local, pudiendo evaluar su utilidad en el seguimiento de los pacientes. Por el momento, las mutaciones recurrentes identificadas en el MU no son accionables a nivel terapéutico, pero es posible que al igual que en otros tipos de cáncer, con el avance de los estudios científicos y la mejor caracterización molecular de los tumores, algunas de estas mutaciones puedan actuar como biomarcadores para predecir la respuesta frente a terapias emergentes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV. DISCUSIÓN FINAL

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV. DISCUSIÓN FINAL

IV.1. DISCUSIÓN FINAL DE LOS HALLAZGOS MÁS REPRESENTATIVOS

IV.1.1 CAPÍTULO 1: BÚSQUEDA DE GENES DE PREDISPOSICIÓN A MELANOMA UVEAL BILATERAL PRIMARIO

El estudio de secuenciación masiva dedicado a la búsqueda de genes de predisposición a MUB llevado a cabo en el capítulo 1, nos ha ayudado a seleccionar variantes genéticas localizadas en genes sin relación previa conocida con el MU como posibles candidatas a explicar la existencia de una predisposición genética frente al desarrollo de un MUB primario en cuatro pacientes no relacionados. Siguiendo la estrategia de priorización de variantes diseñada, no detectamos variantes en heterocigosis comunes a los 4 pacientes (MUB1-MUB4) ni tampoco variantes distintas que afectasen de manera recurrente a los mismos genes. Sin embargo, sí pudimos seleccionar como patogénicas o probablemente patogénicas en posible relación con la patología, variantes nuevas o ya conocidas en genes como *TERF2IP*, *BAX*, *RBBP8*, *ATR*, *LZTS1*, *PREX2* y *TP63*.

La aplicación de la secuenciación masiva, lleva implícita una dificultad asociada a la ardua interpretación de la información obtenida en cada muestra, ya que supera de manera muy considerable a la obtenida mediante técnicas de secuenciación directas y convencionales como la secuenciación Sanger. La mayor parte de las variantes obtenidas en un estudio de secuenciación masiva resultan novedosas y, por lo general, no se dispone de información acerca de su posible efecto a nivel proteico y repercusión clínica. Por ello, en su mayoría, son consideradas de significado incierto y el estudio de su posible implicación, o no, en el desarrollo de una patología concreta, requiere de ensayos funcionales, replicación en cohortes independientes y la re-anotación de las mismas a medida que nueva información puede ser aportada y tenida en cuenta.

El primer paso para la selección de las variantes de significado incierto con potencial interés, requiere el seguimiento de un sistema de priorización que permita seleccionar las variantes con mayor riesgo de tener un efecto deletéreo. En nuestro estudio, la estrategia de priorización se basó fundamentalmente en el empleo de bases de datos clínicas y poblacionales, en el uso de herramientas bioinformáticas de predicción de patogenicidad *in silico* y en la información disponible en la literatura respecto a los genes en cuestión y el posible establecimiento de lazos moleculares entre los mismos y el MU. Estrategia que nos permitió seleccionar un total de 23 variantes para su estudio en profundidad distribuidas entre genes bien conocidos de predisposición a cáncer, genes potencialmente relacionados con cáncer por su implicación en rutas de señalización conocidas e incluso genes implicados en los procesos de reparación de daños en el ADN.

Uno de los principales retos actuales de la genética del cáncer, así como de otras patologías, radica en el establecimiento de evidencias genotipo-fenotipo. Es decir, la posible correlación de la información genética con la información médica. O dicho de otra manera, la posibilidad de estudiar a todos aquellos pacientes que se encuentren en riesgo de desarrollar un fenotipo concreto[237].

De todas las variantes seleccionadas en el estudio, sólo la detectada en el gen *TERF2IP*, mostró evidencias para ser considerada la principal candidata a explicar el desarrollo de un MUB en uno de los pacientes incluidos en el estudio. Aunque, toda la información recolectada apuntaría a una evidencia todavía moderada[248], por el momento, del gen *TERF2IP* como un posible nuevo candidato a la predisposición genética frente al MU y frente a otros tipos de tumores como el cáncer de mama. Parte de estas evidencias se deben a la asunción de la hipótesis de que este gen se comportase de manera similar al gen *POT1*, miembro del mismo complejo proteico de protección telomérica (complejo *shelterina*) y recientemente propuesto como candidato de predisposición genética frente al MU[84]. En el caso de que se confirmase la presencia de variantes patogénicas en este gen en otros pacientes con sospecha de susceptibilidad genética frente a MU en una cohorte independiente, la evidencia de su implicación como gen candidato en la enfermedad podría llegar a ser definitiva[248].

En el caso del resto de los genes preseleccionados como sospecha de candidatos, la evidencia de su implicación en la predisposición frente al MUB fue mucho más limitada (*BAX*, *RBBP8*, *LZTS1*,*ATR*) o incluso insuficiente (*PREX2*, *TP63*), fundamentalmente, por la escasez de información disponible en relación a la predisposición genética frente al MU y especialmente al escaso número de casos descritos con MUB[186]. Y, aunque las variantes detectadas mostraron una frecuencia significativamente mayor en los pacientes que en la población control no-cáncer para estos genes, al igual que en el caso del gen *TERF2IP*, es necesario valorar con cautela estos resultados dado que el escaso número de pacientes estudiados aporta una gran incertidumbre a los resultados estadísticos. Por ello, estudios adicionales de casos-control, o tratar de replicar los resultados de este trabajo en cohortes independientes de pacientes con MU enriquecidos genéticamente (edad temprana de diagnóstico, casos multifocales o bilaterales, coocurrencia con otros tipos de cáncer, o historia familiar de MU) son necesarios para clarificar el papel de estos genes en la susceptibilidad frente al MUB.

De darse el paso de tratar de replicar estos resultados, sería interesante, asimismo, incluir el estudio de otros genes típicamente implicados en predisposición a cáncer y reparación de daños en el ADN para los cuales detectamos variantes de significado incierto en el presente estudio como es el caso, por ejemplo, de *POLN* y *RECQL4*. En base a la bibliografía, ambos mantuvieron interés científico de acuerdo a su posible implicación en el desarrollo del MUB, sin embargo, las variantes identificadas en los mismos no reunieron criterios suficientes de patogenicidad de acuerdo a las guías de la ACMG, manteniéndose únicamente como variantes de significado incierto. En este aspecto, es necesario recordar e insistir, que en los estudios de secuenciación masiva en los cuales se obtiene una gran cantidad de información genética, a menudo de difícil interpretación y comprensión, es altamente recomendable la revisión y reevaluación periódica de los resultados, pudiendo incorporar nuevas evidencias científicas que apoyen la postulación de un gen como candidato o que, en su defecto, excluyan definitivamente su consideración como tal.

En definitiva, es necesario tener en cuenta que el presente estudio, es meramente exploratorio y descriptivo dadas las peculiaridades inherentes a la propia patología. Sin embargo, en nuestro caso, disponer de muestra de 4 pacientes afectados de MUB primario resultó un gran logro en términos de investigación, ya que la aportación de información genética en pacientes con tumores sólidos poco o muy poco comunes, siempre debe ser objeto de consideración. Todo ello sin obviar que la interpretación de la predisposición genética frente a una patología concreta, puede ser complicada debido a la posible existencia de expresividad variable o penetrancia incompleta de ciertas variantes en línea germinal.

Otra de las principales limitaciones del trabajo, fue la imposibilidad de llevar a cabo un estudio de secuenciación en muestra tumoral de los pacientes, lo cual facilitaría la comprensión, priorización y selección definitiva de genes candidatos. Ya que, de acuerdo a la hipótesis del "doble *hit*" de Knudson, otra indicación de causalidad de una variante germinal en cáncer radica en la presencia de un segundo *hit* mutacional en la muestra tumoral en el mismo gen en el cual se identificó una variante patogénica a nivel germinal[314]. Por todo ello, la creación de grupos colaborativos a nivel internacional resultaría de gran utilidad para llevar a cabo estudios de este tipo, especialmente en aquellos que se enfrentan a patologías de extremada rareza como la aquí presentada.

Globalmente, el estudio de secuenciación masiva mostrado en el capítulo 1, sugiere que el empleo de exomas dirigidos abre la posibilidad de identificar variantes deletéreas que, aunque podrían no estar asociadas *a priori* con la predisposición genética a MUB, pueden resultar de utilidad desplegando oportunidades a la comunidad científica dedicada al estudio de las bases genéticas del MU.

Además, la información obtenida puede ser especialmente útil en casos en los que no esté muy clara la historia clínica y familiar del paciente. Ya que, dichas variantes podrían explicar la coocurrencia de ciertos fenotipos y, por ello, no conviene descartarlas de manera inicial. Ante el desconocimiento real del posible efecto de las variantes seleccionadas en este estudio, no sólo sobre la predisposición frente al MUB sino también sobre el desarrollo de otros tipos de neoplasias, no estaría de más prestar especial atención al seguimiento de los pacientes

portadores de dichas variantes y a sus familiares, con el fin de poder confirmar o descartar su posible implicación en el MUB y otras neoplasias que pudiesen desarrollarse en los individuos portadores.

Recientemente se ha descrito en la literatura que la presencia de variantes raras en genes conocidos de predisposición a cáncer, puede ser más común de lo previsto en formas de cáncer atípicas[465]. Y, por consiguiente, descartar las variantes aun de significado incierto en genes sin relación conocida con el cáncer en estudio, podría resultar un atrevimiento. Con todo, es necesario ser precavidos con el manejo de esta información de cara al paciente, ya que la transmisión de información muy extensa y poco clarificada puede tener un gran impacto psicológico sobre el mismo y sus familiares que no debe obviarse.

En conclusión, la información disponible hasta la fecha acerca de la predisposición genética frente al MU, sugiere la existencia de heterogeneidad genética en la causalidad del mismo, donde *BAP1* sería el principal gen asociado a este tumor y donde variantes patogénicas en otros genes explicarían, por el momento, casos puntuales. Además, no puede descartarse que la aparición de un MUB muestre relación con otros factores genéticos o epigenéticos o incluso con determinadas características ambientales, a pesar de que en el caso del MU no son precisamente las condiciones ambientales las que parecen conferir un mayor riesgo[50]. En este contexto, tampoco puede descartarse que en ciertos individuos la existencia de una predisposición genética pueda deberse a la contribución de alelos de susceptibilidad de baja o moderada penetrancia. Una hipótesis ya empleada para explicar la susceptibilidad frente a otros tipos de cáncer más estudiados como el de mama, donde se ha propuesto que una parte de la heredabilidad podría estar explicada por el efecto multiplicativo de alelos de bajo riesgo[466]. Por ello, con el paso de los años y el incremento de la aplicación de las tecnologías de secuenciación masiva al estudio de las bases genéticas del MU, nuevos genes candidatos podrían ser propuestos. Centrarse en la obtención de información genética válida, puede ayudar a predecir el desarrollo de un tumor en el ojo contralateral en un paciente ya afectado por un MU o, al menos, justificaría la intensificación del examen oftalmológico en la búsqueda de esta posibilidad.

IV.2.2 CAPÍTULOS 2 Y 3: PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES CON MELANOMA UVEAL ASOCIADO AL ESTUDIO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y MUTACIONES SOMÁTICAS

Los capítulos 2 y 3 de esta tesis doctoral, se focalizaron en el estudio de una parte de la variación genética somática en el MU, de cara a poder predecir el curso de la enfermedad de los pacientes afectados por esta patología mediante el establecimiento de posibles grupos y subgrupos pronóstico.

Un claro ejemplo de éxito en la incorporación de estos estudios a la práctica clínica, lo constituyen las neoplasias hematológicas, donde se ha logrado, no solo la identificación de marcadores citogenéticos y moleculares que constituyen dianas terapeúticas totalmente accionables en la actualidad, sino también el establecimiento de perfiles moleculares cada vez más específicos de cada paciente y patología, permitiendo que estos puedan beneficiarse de su inclusión en nuevos ensayos terapéuticos y de un manejo clínico más personalizado.

La secuenciación masiva ha cobrado una gran importancia en el área de la oncología clínica, posibilitando la obtención de una gran cantidad de información genética a un coste reducido, facilitando la comprensión de los mecanismos biológicos subyacentes a distintos tipos de cáncer, resultando en la definición de nuevos subgrupos dentro de una misma variedad, o en el descubrimiento de biomarcadores con fines diagnósticos, pronósticos y terapéuticos. Toda esta información ha sido obtenida, fundamentalmente, gracias al esfuerzo inicial y continuo de grandes consorcios[467] y a la creación de grandes repositorios de datos accesibles a toda la comunidad científica como TCGA[468] o COSMIC[267]. Pero también a la aportación constante derivada de los estudios individuales de pequeños grupos de investigación a nivel mundial.

Dentro de las distintas aproximaciones de NGS existentes y utilizadas en la actualidad para el estudio del cáncer, el empleo de paneles de genes especialmente diseñados, se ha forjado un prometedor porvenir en el campo de la oncología clínica. Esta aproximación permite la identificación rápida y con elevada fiabilidad de las alteraciones más comúnmente descritas en la oncología de precisión en los distintos tipos de cáncer. Los paneles de genes, a diferencia de otros

métodos de secuenciación más tradicionales, ofrecen la ventaja de lograr grandes profundidades de lectura de posiciones concretas del genoma y coberturas de exones muy elevadas[453,469].

En el caso del MU, se han publicado algunos trabajos en los cuales se describe la eficacia del empleo de este tipo de metodología aplicadas, mayoritariamente, al establecimiento de subgrupos de riesgo metastásico[386,387,459]. Sin embargo, los esfuerzos en el MU se encuentran muy limitados en comparación con otros tipos de cáncer, debido, en parte, a su reducida incidencia en la población. Por ello, la intervención de la comunidad científica en el estudio del mismo, aunque creciente, se limita en la actualidad a grupos con un interés casi histórico por esta enfermedad. Además, como hemos visto, en el MU no se han descrito todavía terapias específicas con eficacia reportada y el tratamiento continúa siendo meramente local. No obstante, a pesar de que, por el momento, las mutaciones somáticas descritas en el MU no son accionables a nivel terapéutico, el conocimiento molecular y genético de este tipo de tumores, abre oportunidades hacia el uso de biomarcadores con fin pronóstico o que permitan predecir la respuesta frente a fármacos específicos.

En el trabajo presentado en el capítulo 3 se diseñó un panel de genes específico para el estudio del MU. Con los datos obtenidos, se procedió a la búsqueda de posibles asociaciones estadísticas entre los distintos hallazgos genéticos, clínicos y demográficos tenidos en cuenta, así como a la evaluación de curvas de supervivencia mediante estudios Kaplan-Meier, con el fin de diferenciar grupos de riesgo metastásico que permitiesen identificar a los pacientes de mayor riesgo. Los resultados obtenidos fueron comparados con estudios pioneros en el campo y con los más actuales para explorar la validez de esta nueva metodología y la posibilidad de su incorporación a la rutina clínica de la unidad.

Mediante este trabajo, se incrementó, por tanto, el esfuerzo de la comunidad científica por seguir avanzando en el conocimiento de las bases genéticas del MU y el comportamiento de los tumores en base a las mismas. Además, hasta donde llega nuestro conocimiento, se trata del primer estudio publicado de secuenciación masiva aplicada al MU en una cohorte de pacientes española. Los resultados obtenidos de este

estudio, nos permitieron establecer perfiles moleculares más específicos de cada tumor, donde además de tener en cuenta el perfil asociado a la presencia de alteraciones en los cromosomas 1p, 3, 6 y 8 estudiadas mediante MLPA en el capítulo 2, valoramos la presencia de mutaciones en genes con valor pronóstico en MU.

Así, comprobamos que, aunque la M3 se ha descrito como la alteración genética con mayor valor pronóstico en el MU[18,50,230], la clasificación pronóstica de los pacientes no debe ceñirse a un modelo dicotómico basado en el estado en el número de copia del cromosoma 3. La presencia de otras alteraciones cromosómicas debe ser considerada a la hora de clasificar a los pacientes en cuanto a riesgo genético de metástasis, tal y como vimos en el capítulo 2 de estas tesis y de acuerdo a los sugerido también por otros grupos[334,357,376]. Pero, además, en nuestro trabajo el estado mutacional del gen *BAP1*, se posiciona como una de las principales características genéticas a tener en cuenta de cara a estudiar la posible evolución clínica de un paciente afectado de MU. De hecho, observamos que la combinación de ambas alteraciones en un mismo MU incrementaba significativamente el riesgo de desarrollar enfermedad metastásica. Mientras que la evaluación del efecto pronóstico asociado a la presencia de mutaciones en los genes *SF3B1* y *EIF1AX*, requiere, en contraposición, su estudio a tiempos más largos de seguimientos de los pacientes[151].

En el MU, sin embargo, el conocimiento aportado por los estudios genéticos con valor pronóstico, se transfiere muy lentamente a la práctica clínica, ya que, desafortunadamente, todavía no existe una evidencia para demostrar que el cambio en el seguimiento de los pacientes como resultado de la información aportada por los estudios genéticos resulte en un cambio muy notable en su supervivencia. Y, por tanto, ante la reticencia de algunos servicios de oncología ocular a incorporar los estudios genéticos con fines pronósticos en el día a día de la práctica asistencial habitual, sólo un pequeño porcentaje de individuos afectados de MU pueden beneficiarse de estas aproximaciones. A pesar de ello, resulta evidente que, *a priori*, mediante la distinción de los pacientes de alto riesgo, se ha facilitado la comprensión del comportamiento molecular de los MU más agresivos. Y es que, para conocer el punto débil del MU, al igual que en otros tipos

de cáncer, es necesario un conocimiento profundo de sus características celulares y moleculares y esta voluntad, es únicamente posible mediante la caracterización molecular completa de cada vez más tumores, el desarrollo de mejores modelos celulares y animales y la prueba de nuevos fármacos.

En cualquier caso, tal y como ocurre en otros procedimientos médicos, es absolutamente necesario que el paciente que decide someterse a este tipo de pruebas esté informado, de manera clara y concisa, de las limitaciones que ofrece esta técnica y de las posibles complicaciones clínicas. Asimismo, es necesario valorar la posible repercusión psicológica que puede tener el conocimiento del resultado de esta prueba para el paciente. A este respecto, en estudios destinados a evaluar el posible impacto psicológico de los test genéticos con valor pronóstico en pacientes con MU, se vio que el requerimiento de intervenciones psico-oncológicas era similar entre pacientes que accedían a conocer la información pronóstica frente a los que prescindían de la misma y que el conocimiento de estos resultados no se asociaba a un menor bienestar posterior de los pacientes. Sino que reducía sus condiciones mentales adversas y mejoraba la precisión de la percepción del riesgo asociado a su enfermedad. Además, se vio que la aceptación de tratamientos como la enucleación podía tener incluso una mayor repercusión psicológica[470,471].

IV.2. Escenario presente y futuro de la investigación en el melanoma uveal

Tal y como se ha relatado en los distintos apartados de esta tesis doctoral, en las últimas décadas, se han realizado intensos esfuerzos por tratar de comprender las bases moleculares y genéticas del MU. Conocer los mecanismos genéticos implicados en el desarrollo y la progresión de estos tumores resultó el objeto fundamental de la mayor parte de trabajos focalizados en la identificación de pacientes con riesgo incrementado de sufrir una progresión fatal de la enfermedad, e identificar vías de señalización que pudiesen constituir dianas terapéuticas potenciales para los melanocitos neoplásicos. En este contexto, hoy en día, y gracias al enorme esfuerzo realizado con las inherentes dificultades asociadas al estudio de un cáncer de baja

incidencia poblacional, el MU podría ser uno de los tumores sólidos mejor caracterizados a nivel molecular, aunque con mucho camino por recorrer y mucha incertidumbre por subsanar, todavía.

En líneas generales, pueden distinguirse dos grupos fundamentales de MU en cuanto a riesgo de metástasis que, a su vez pueden ser divididos en subgrupos pronóstico en base a características clínicas, histopatológicas, moleculares y genéticas[155]. El estudio de este compendio de características es el que nos permite predecir con una mayor precisión el riesgo de metástasis de un paciente concreto. Por ello, la incorporación de toda esta información en el proceso diagnóstico y seguimiento de los pacientes afectados por esta patología en las unidades de oncología ocular, supone un acercamiento real y necesario de estos pacientes a la actual medicina de precisión. En este aspecto, insistimos en la palabra "acercamiento" porque, a pesar de todo lo logrado hasta el momento, la aplicación absoluta de lo que idealmente debería suponer la verdadera medicina de precisión todavía no está generalizada por varios motivos.

En primer lugar, la baja incidencia poblacional del MU desvía en numerosas ocasiones el foco de interés hacia otros tumores malignos más extendidos en la población y, por ello, los esfuerzos económicos, tanto públicos como privados, destinados al manejo clínico más actualizado de estos pacientes resultan limitados. Es crucial comprender que al igual que en otros tipos de cáncer, en el caso del MU urge un avance multidisciplinar obligado, donde clínica, investigación traslacional e investigación básica se integren en un todo. Especialmente, si nos situamos en el escenario de que siendo uno de los tumores mejor caracterizados a nivel molecular en cuanto a la propia carcinogénesis, los mecanismos de desarrollo metastásico y el elevado tropismo hepático siguen siendo escasamente comprendidos.

A todo ello, hay que sumar que, desafortunadamente, los avances logrados en el conocimiento acerca del diagnóstico y el pronóstico del MU, no son parejos a los descritos en el área terapéutica en cuanto a la eficacia de las distintas drogas, por lo que la supervivencia de los pacientes con MU se ha mantenido estable a lo largo de las décadas, y su pronóstico continúa siendo, a menudo, desalentador[174,472].

Históricamente, los pacientes con MU metastásico, eran sometidos a tratamientos quimioterápicos propios del melanoma maligno cutáneo, generalmente con escaso o nulo rendimiento terapéutico. El descubrimiento de las mutaciones en *GNAQ* y *GNA11*, que conlleva una activación constitutiva de la vía de señalización MAPK, postuló a esta vía como una posible diana terapéutica frente a la cual actuar para frenar o inhibir el desarrollo de un MU. Sin embargo, este tumor es poco sensible a la inhibición de esta vía, independientemente del tipo de molécula o droga empleada. Similarmente, otras terapias dirigidas probadas, tampoco han mostrado resultados prometedores en pacientes con MU metastásico[291]. Por otro lado, la inmunoterapia, que resulta también menos eficaz en el MU que en el MMC, está en la actualidad en el foco de varias estudios y ensayos clínicos[174,473]. Y, algunos ensayos terapéuticos en curso, están demostrando que la combinación de ciertas terapias conduce a enfoques terapéuticos prometedores que tienen como objetivo modular y mantener la respuesta inmunológica antitumoral[174]. Es, por tanto, evidente que el trabajo de investigación entorno al MU no ha terminado, ya que, si bien hoy en día disponemos de un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares que llevan al avance fatal de la enfermedad, los conocimientos en el área terapéutica y en el desarrollo de terapias eficaces, todavía requieren una gran atención.

Otra de las grandes necesidades que no conviene descuidar en el estudio del MU, es la búsqueda de biomarcadores que permitan estratificar a los pacientes y monitorizar el curso de la enfermedad sin la necesidad de recurrir a técnicas como la biopsia pronóstica, que, aunque altamente eficaces, son invasivas y presentan sus propias limitaciones y complicaciones asociadas. Una de las más destacables características clínicas del MU es su capacidad de metastatizar por vía hematógena[100], por lo que el hallazgo de nuevos biomarcadores circulantes a nivel sanguíneo que permitan detectar y diagnosticar MU en diferentes etapas de la enfermedad, resulta primordial.

En definitiva, en el futuro, la aproximación diagnóstica ideal a seguir en el MU, será aquella que sea capaz de integrar en pruebas menos invasivas, altamente sensibles y reproducibles, los avances moleculares emergentes y clásicos en cuanto a diagnóstico, pronóstico

e idealmente, posible estrategia terapéutica a seguir. La combinación de la utilización de nuevos biomarcadores moleculares sanguíneos, con las pruebas actualmente establecidas en la rutina de las unidades clínicas, representaría un gran avance en el proceso de toma de decisiones y en el enfoque clínico para el tratamiento de estos pacientes. Asimismo, la inclusión de la información aportada por las plataformas de secuenciación masiva en el manejo clínico rutinario de los pacientes en las unidades de oncología ocular, podría allanar el camino hacia la individualización del tratamiento de los mismos. Además, el uso clínico de la NGS podría permitir identificar alteraciones genéticas, no conocidas, en pacientes que hayan sido buenos respondedores a nuevas terapias, o identificar pacientes que puedan beneficiarse de nuevos ensayos clínicos focalizados en perfiles moleculares muy específicos.

IV.3. ALCANCE CIENTÍFICO DE LA TESIS DOCTORAL

El alcance del trabajo presentado en esta tesis doctoral, radica en el empleo de distintas herramientas y aproximaciones moleculares aplicadas al estudio de la genómica en el MU, con el objetivo primordial de proporcionar nueva información genética o ampliar el conocimiento ya disponible en este campo. Pero, sobre todo, en el deseo de mejorar la atención asistencial de los pacientes afectados por esta dolencia en el marco del establecimiento de un grupo multidisciplinar donde la vertiente más puramente clínica se entrelaza con las aportaciones derivadas de los estudios moleculares y genéticos que surgen de una estrecha colaboración entre las distintas disciplinas.

El descubrimiento de genes adicionales que predispongan al MU, es como ya comentamos, crucial para identificar posibles nuevas rutas de señalización alteradas en estos tumores. Además, la identificación de factores genéticos de predisposición a MU urge de cara a predecir quién tendrá un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, permitiendo una detección y terapia tempranas, y un manejo optimizado del paciente. A este respecto, los resultados obtenidos en el trabajo presentado en el capítulo 1 de esta tesis doctoral, justificarían la extensión de la investigación a otras cohortes de pacientes con MU enriquecidas genéticamente. Mientras que los resultados obtenidos en cuanto a pronóstico y estratificación en grupos de riesgo metastásico

llevados a cabo en los capítulos 2 y 3, encontrándose en línea con otros similares publicados recientemente, demuestran y apoyan su traslación clínica a la práctica habitual de las unidades de oncología ocular, tal y como viene sucediendo con estudios de naturaleza similar aplicados a pacientes afectados por otro tipo de neoplasias.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

V. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PRIMERA: La observación de la ausencia de mutaciones germinales en el gen *BAP1* y en otros genes descritos como candidatos a explicar la predisposición al MU en los cuatro pacientes diagnosticados de MUB primario, apoya la existencia de heterogeneidad de locus en la predisposición genética frente a esta neoplasia maligna. En este modelo de etiología genética heterogénea, el gen *BAP1* continuaría siendo el único con evidencia definitiva de implicación en la susceptibilidad genética frente al MU, mientras que las mutaciones en otros genes explicarían, por el momento, casos puntuales.

SEGUNDA: El estudio de exomas dirigidos en ADN germinal de pacientes diagnosticados de MUB primario, ha permitido la selección de posibles genes candidatos con interés clínico de cara a explicar la existencia de una predisposición genética frente al MUB. En el momento actual, ante el amplio desconocimiento científico existente en relación a la susceptibilidad genética frente al MU, la interpretación de los resultados derivados de estrategias de secuenciación de mayor capacidad, como la secuenciación de exoma o genoma completo, resultaría todavía complicada.

TERCERA: La detección de una mutación truncante en el gen *TERF2IP* en un paciente con MUB y cáncer de mama, no parece un evento aleatorio, ya que dicha mutación ha sido descrita en relación a predisposición frente a otros tipos de cáncer como el de mama o el melanoma cutáneo, y mutaciones en otros genes implicados en el complejo proteico *shelterina* se han descrito como candidatas a predisposición genética frente al MU. La detección de otras variantes probablemente patogénicas en los genes *BAX*, *RBBP8*, *ATR*, *LZTS1*,*PREX2* y *TP63* ofrecen una evidencia limitada o escasa, por el momento, como candidatos a explicar la susceptibilidad genética frente al MUB.

CUARTA: La detección de variantes en genes conocidos de predisposición a cáncer o reparación de daños en el ADN como las detectadas en *RAD54L*, *SMAD4*, *APC*, *PDGFRA*, *HELQ* y *RECQL4* surgen en este estudio como variantes de significado incierto en

relación a la predisposición genética frente al MUB. Estos hallazgos merecen una investigación más profunda, pues no puede descartarse la contribución de genes de penetrancia moderada o baja al desarrollo de estos tumores, teniendo en cuenta que la descripción de variantes raras en genes conocidos de predisposición a cáncer parece común en tumores atípicos.

QUINTA: Dada la extremada rareza del melanoma uveal bilateral primario, la información derivada del extenso estudio genómico llevado a cabo en los cuatro pacientes afectados de esta patología, resulta de por sí informativa para la comunidad científica. De modo que, investigaciones adicionales desarrolladas en base a los resultados descritos en esta tesis podrían arrojar luz, no sólo sobre el desarrollo extraordinario de un MUB primario, sino también sobre el desarrollo de melanoma uveal unilateral primario en otros pacientes y su posible manejo clínico.

SEXTA: El análisis de la presencia de alteraciones cromosómicas somáticas en pacientes con MU mediante MLPA, demostró la utilidad de la biopsia pronóstica en esta neoplasia para la identificación de pacientes con elevado riesgo de desarrollar enfermedad metastásica. La comparación de los resultados obtenidos para muestras tomadas de fragmento tumoral tras enucleación, endorresección, o biopsia-aspiración con aguja fina no ofreció diferencias estadísticamente significativas, reportando una eficacia similar en la detección de las alteraciones cromosómicas e incluso con ejemplos de mayor eficacia diagnóstica bajo el estudio de muestras obtenidas por biopsia-aspiración.

SÉPTIMA: Los datos derivados del estudio mediante MLPA de una cohorte de 89 pacientes revelaron que el 42,8% de los que obtuvieron un resultado concluyente para esta prueba, mostraron M3. Se confirmó una asociación significativa entre la M3 y el desarrollo de enfermedad metastásica, así como una reducción significativa de la supervivencia libre de metástasis en pacientes con M3 frente a los que mostraron dosis normal para el cromosoma 3.

OCTAVA: Se confirmó la existencia de una correlación positiva entre la presencia de ganancias en 8q, pérdidas en 1p, 6q y 8p y el desarrollo de enfermedad metastásica en la cohorte de pacientes estudiada. Dichos hallazgos desplazan a la clasificación pronóstica bimodal asociada al estado del cromosoma 3, permitiendo el establecimiento de subgrupos pronóstico.

NOVENA: El estado mutacional del gen *BAP1* incrementa la precisión en la estratificación pronóstica de los pacientes con MU. Las mutaciones somáticas en este gen, se asocian con una pronunciada reducción de la supervivencia libre de metástasis de los pacientes, efecto que se agudiza en aquellos que además presentan M3. Estos resultados, desvían, nuevamente, la clasificación pronóstica bimodal asociada al estado en el número de copia del cromosoma 3, apoyando la importancia de la valoración de un perfil genético lo más completo posible para una correcta estratificación y pronóstico de supervivencia de los pacientes con MU.

DÉCIMA: El análisis del estado mutacional de los genes *SF3B1* y *EIF1AX* en esta tesis doctoral, no apoya, por el momento, su intervención en el pronóstico del MU como genes asociados a riesgo intermedio y muy bajo de metástasis, respectivamente. A medida que el tiempo de seguimiento de los pacientes se incremente, los estudios de supervivencia para ambos genes podrían tornarse significativos, especialmente en el caso del gen *SF3B1*, ya que mutaciones en el mismo se han vinculado al desarrollo tardío de enfermedad metastásica.

UNDÉCIMA: Pese a que los resultados de MLPA son de gran utilidad de cara a predecir el pronóstico de los pacientes con MU, la inclusión de información procedente de la secuenciación masiva, agudiza la definición de subgrupos pronóstico, aportando un perfil molecular más específico de cada MU y posibilitando un seguimiento y manejo clínico de los pacientes más acorde a su enfermedad. El diseño de un panel de genes que permita la detección la alteraciones cromosómicas y mutaciones puntuales en un único ensayo, sería la aproximación molecular idónea con el conocimiento disponible en la actualidad.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Singh, A.D., Bergman, L. & Seregard, S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol Clin North Am* **18**, 75-84, viii (2005).
2. Chang, A.E., Karnell, L.H. & Menck, H.R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* **83**, 1664-78 (1998).
3. Singh, A.D. & Topham, A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* **110**, 956-61 (2003).
4. Yonekawa, Y. & Kim, I.K. Epidemiology and management of uveal melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **26**, 1169-84 (2012).
5. Hu, D.N., Yu, G.P., McCormick, S.A., Schneider, S. & Finger, P.T. Population-based incidence of uveal melanoma in various races and ethnic groups. *Am J Ophthalmol* **140**, 612-7 (2005).
6. Shields, C.L. *et al.* Prognosis of uveal melanoma based on race in 8100 patients: The 2015 Doyne Lecture. *Eye (Lond)* **29**, 1027-35 (2015).
7. Virgili, G. *et al.* Incidence of uveal melanoma in Europe. *Ophthalmology* **114**, 2309-15 (2007).
8. Yu, G.P., Hu, D.N. & McCormick, S.A. Latitude and incidence of ocular melanoma. *Photochem Photobiol* **82**, 1621-6 (2006).
9. Weis, E., Shah, C.P., Lajous, M., Shields, J.A. & Shields, C.L. The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis. *Arch Ophthalmol* **124**, 54-60 (2006).
10. Raivio, I. Uveal melanoma in Finland. An epidemiological, clinical, histological and prognostic study. *Acta Ophthalmol Suppl*, 1-64 (1977).
11. Singh, A.D., Shields, C.L., Shields, J.A. & Sato, T. Uveal melanoma in young patients. *Arch Ophthalmol* **118**, 918-23 (2000).
12. Graell, X. *et al.* [Age distribution of uveal melanoma and its relationship to survival]. *Arch Soc Esp Oftalmol* **82**, 343-7 (2007).
13. Fry, M.V., Augsburger, J.J., Hall, J. & Correa, Z.M. Posterior uveal melanoma in adolescents and children: current perspectives. *Clin Ophthalmol* **12**, 2205-2212 (2018).
14. Barr, C.C., McLean, I.W. & Zimmerman, L.E. Uveal melanoma in children and adolescents. *Arch Ophthalmol* **99**, 2133-6 (1981).

15. Kaliki, S. *et al.* Influence of age on prognosis of young patients with uveal melanoma: a matched retrospective cohort study. *Eur J Ophthalmol* **23**, 208-16 (2013).
16. Palazzi, M.A. *et al.* Congenital uveal malignant melanoma: a case report. *Can J Ophthalmol* **40**, 611-5 (2005).
17. Broadway, D. *et al.* Congenital malignant melanoma of the eye. *Cancer* **67**, 2642-52 (1991).
18. Damato, B.E., Singh Arun D. Clinical Ophthalmic Oncology-Uveal Melanoma. in *Clinical Ophthalmic Oncology-Uveal Tumors*, Vol. Uveal Melanoma (ed. Springer) (2019).
19. Andreoli, M.T., Mieler, W.F. & Leiderman, Y.I. Epidemiological trends in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* **99**, 1550-3 (2015).
20. Singh, A.D., Turell, M.E. & Topham, A.K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* **118**, 1881-5 (2011).
21. Kaliki, S., Shields, C.L. & Shields, J.A. Uveal melanoma: estimating prognosis. *Indian J Ophthalmol* **63**, 93-102 (2015).
22. Zloto, O., Pe'er, J. & Frenkel, S. Gender differences in clinical presentation and prognosis of uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 652-6 (2013).
23. Vicente, N. *et al.* [Uveal melanoma: clinical characteristics, treatment and survival in a series of 500 patients]. *Arch Soc Esp Oftalmol* **88**, 433-8 (2013).
24. Virgili, G. *et al.* Survival in patients with uveal melanoma in Europe. *Arch Ophthalmol* **126**, 1413-8 (2008).
25. Frenkel, S., Hendler, K. & Pe'er, J. Uveal melanoma in Israel in the last two decades: characterization, treatment and prognosis. *Isr Med Assoc J* **11**, 280-5 (2009).
26. Caminal, J.M. *et al.* Relative survival of patients with uveal melanoma managed in a single center. *Melanoma Res* **22**, 271-7 (2012).
27. Diener-West, M., Hawkins, B.S., Markowitz, J.A. & Schachat, A.P. A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. *Arch Ophthalmol* **110**, 245-50 (1992).
28. Diener-West, M. *et al.* Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch Ophthalmol* **123**, 1639-43 (2005).

29. Shields, J.A., Augsburger, J.J., Donoso, L.A., Bernardino, V.B., Jr. & Portenar, M. Hepatic metastasis and orbital recurrence of uveal melanoma after 42 years. *Am J Ophthalmol* **100**, 666-8 (1985).
30. Pandiani, C., Beranger, G.E., Leclerc, J., Ballotti, R. & Bertolotto, C. Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. *Genes Dev* **31**, 724-743 (2017).
31. van der Kooij, M.K., Speetjens, F.M., van der Burg, S.H. & Kapiteijn, E. Uveal Versus Cutaneous Melanoma; Same Origin, Very Distinct Tumor Types. *Cancers (Basel)* **11**(2019).
32. Naumann, G., Yanoff, M. & Zimmerman, L.E. Histogenesis of malignant melanomas of the uvea. I. Histopathologic characteristics of nevi of the choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* **76**, 784-96 (1966).
33. Yanoff, M. & Zimmerman, L.E. Histogenesis of malignant melanomas of the uvea. II. Relationship of uveal nevi to malignant melanomas. *Cancer* **20**, 493-507 (1967).
34. Kaiserman, I., Kaiserman, N. & Pe'er, J. Long term ultrasonic follow up of choroidal naevi and their transformation to melanomas. *Br J Ophthalmol* **90**, 994-8 (2006).
35. Gass, J.D. Problems in the differential diagnosis of choroidal nevi and malignant melanoma. XXXIII Edward Jackson Memorial lecture. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **83**, 19-48 (1977).
36. Sumich, P., Mitchell, P. & Wang, J.J. Choroidal nevi in a white population: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* **116**, 645-50 (1998).
37. Waheed, N.F. Melanoma, iris. (2008).
38. García-Valenzuela E PM, B., Elliot D. Melanoma, ciliary body. (2007).
39. Ng, C.H., Wang, J.J., Mitchell, P., Amirul Islam, F.M. & Wong, T.Y. Prevalence and characteristics of choroidal nevi in an Asian vs white population. *Arch Ophthalmol* **127**, 314-9 (2009).
40. Singh, A.D., Kalyani, P. & Topham, A. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology* **112**, 1784-9 (2005).
41. Singh, A.D. *et al.* Small choroidal melanocytic lesions: features predictive of growth. *Ophthalmology* **113**, 1032-9 (2006).
42. Shields, C.L. *et al.* Clinical spectrum of choroidal nevi based on age at presentation in 3422 consecutive eyes. *Ophthalmology* **115**, 546-552 e2 (2008).

43. Shields, C.L. *et al.* Choroidal nevus transformation into melanoma: analysis of 2514 consecutive cases. *Arch Ophthalmol* **127**, 981-7 (2009).
44. Spaldon DJ, H.R. Anatonía Normal. in *Atlas de Oftalmología Clínica.* (ed. ELSEVIER) 258-276 (2006).
45. BioRender.com.
46. Shields JA, S.C. *Intraocular tumors: a text and atlas*, (1992).
47. Shields, C.L. *et al.* Iris melanoma: features and prognosis in 317 children and adults. *J AAPOS* **16**, 10-6 (2012).
48. Nayman, T., Bostan, C., Logan, P. & Burnier, M.N., Jr. Uveal Melanoma Risk Factors: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Curr Eye Res* **42**, 1085-1093 (2017).
49. SERV. *Melanoma Uveal- Guías de práctica clínica de la SERV*, (2016).
50. Jager, M.J. *et al.* Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Primers* **6**, 24 (2020).
51. Shields, C.L. *et al.* Uveal melanoma in children and teenagers. *Saudi J Ophthalmol* **27**, 197-201 (2013).
52. Papastefanou, V.P. & Cohen, V.M. Uveal melanoma. *J Skin Cancer* **2011**, 573974 (2011).
53. Li, W., Judge, H., Gragoudas, E.S., Seddon, J.M. & Egan, K.M. Patterns of tumor initiation in choroidal melanoma. *Cancer Res* **60**, 3757-60 (2000).
54. García-Valenzuela E PM, P.J., Davidson C. Melanoma, choroidal. (2009).
55. Hu, D.N., McCormick, S.A. & Yu, G.P. Latitude and uveal melanoma. *Ophthalmology* **115**, 757; author reply 757-9 (2008).
56. Singh, A.D., Rennie, I.G., Seregard, S., Giblin, M. & McKenzie, J. Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* **49**, 419-28 (2004).
57. Johnson, M.W., Skuta, G.L., Kincaid, M.C., Nelson, C.C. & Wolter, J.R. Malignant melanoma of the iris in xeroderma pigmentosum. *Arch Ophthalmol* **107**, 402-7 (1989).
58. Shah, C.P., Weis, E., Lajous, M., Shields, J.A. & Shields, C.L. Intermittent and chronic ultraviolet light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology* **112**, 1599-607 (2005).
59. Holly, E.A., Aston, D.A., Char, D.H., Kristiansen, J.J. & Ahn, D.K. Uveal melanoma in relation to ultraviolet light exposure and host factors. *Cancer Res* **50**, 5773-7 (1990).

60. Guenel, P. *et al.* Occupational risk factors, ultraviolet radiation, and ocular melanoma: a case-control study in France. *Cancer Causes Control* **12**, 451-9 (2001).
61. Fernandes, B.F., Marshall, J.C. & Burnier, M.N., Jr. Blue light exposure and uveal melanoma. *Ophthalmology* **113**, 1062 e1; author reply 1062 (2006).
62. Di Cesare, S. *et al.* The effect of blue light exposure in an ocular melanoma animal model. *J Exp Clin Cancer Res* **28**, 48 (2009).
63. Schmidt-Pokrzywniak, A., Jockel, K.H., Bornfeld, N., Sauerwein, W. & Stang, A. Positive interaction between light iris color and ultraviolet radiation in relation to the risk of uveal melanoma: a case-control study. *Ophthalmology* **116**, 340-8 (2009).
64. Holly, E.A., Aston, D.A., Ahn, D.K. & Smith, A.H. Intraocular melanoma linked to occupations and chemical exposures. *Epidemiology* **7**, 55-61 (1996).
65. Zinkhan, M. *et al.* Having children, social characteristics, smoking and the risk of uveal melanoma: a case-control study. *Ophthalmic Epidemiol* **20**, 360-8 (2013).
66. Stang, A. *et al.* Mobile phone use and risk of uveal melanoma: results of the risk factors for uveal melanoma case-control study. *J Natl Cancer Inst* **101**, 120-3 (2009).
67. Stang, A. *et al.* Cooking and uveal melanoma risk: results from two German case-control studies. *Cancer Causes Control* **14**, 377-80 (2003).
68. Lutz, J.M. *et al.* Occupational risks for uveal melanoma results from a case-control study in nine European countries. *Cancer Causes Control* **16**, 437-47 (2005).
69. Carreno, E. *et al.* Prevalence of ocular and oculodermal melanocytosis in Spanish population with uveal melanoma. *Eye (Lond)* **26**, 159-62 (2012).
70. Van Raamsdonk, C.D. *et al.* Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* **363**, 2191-9 (2010).
71. Weis, E., Shah, C.P., Lajous, M., Shields, J.A. & Shields, C.L. The association of cutaneous and iris nevi with uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology* **116**, 536-543 e2 (2009).
72. Onesti, M.G. *et al.* Management and follow-up of a patient with Familial Atypical Multiple Mole-Melanoma (FAMMM) Syndrome. *G Chir* **33**, 132-5 (2012).

73. van Hees, C.L. *et al.* Are atypical nevi a risk factor for uveal melanoma? A case-control study. *J Invest Dermatol* **103**, 202-5 (1994).
74. Yanoff, M. & Zimmerman, L.E. Histogenesis of malignant melanomas of the uvea. 3. The relationship of congenital ocular melanocytosis and neurofibromatosis in uveal melanomas. *Arch Ophthalmol* **77**, 331-6 (1967).
75. Foster, W.J., Fuller, C.E., Perry, A. & Harbour, J.W. Status of the NF1 tumor suppressor locus in uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* **121**, 1311-5 (2003).
76. Honavar, S.G., Singh, A.D., Shields, C.L., Shields, J.A. & Eagle, R.C., Jr. Iris melanoma in a patient with neurofibromatosis. *Surv Ophthalmol* **45**, 231-6 (2000).
77. Abdel-Rahman, M.H. *et al.* Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J Med Genet* **48**, 856-9 (2011).
78. Aoude, L.G., Vajdic, C.M., Kricker, A., Armstrong, B. & Hayward, N.K. Prevalence of germline BAP1 mutation in a population-based sample of uveal melanoma cases. *Pigment Cell Melanoma Res* **26**, 278-9 (2013).
79. Arzt, L., Quehenberger, F., Halbwedl, I., Mairinger, T. & Popper, H.H. BAP1 protein is a progression factor in malignant pleural mesothelioma. *Pathol Oncol Res* **20**, 145-51 (2014).
80. Ferguson, R. *et al.* Genetic markers of pigmentation are novel risk loci for uveal melanoma. *Sci Rep* **6**, 31191 (2016).
81. Mobuchon, L. *et al.* A GWAS in uveal melanoma identifies risk polymorphisms in the CLPTM1L locus. *NPJ Genom Med* **2**(2017).
82. Abdel-Rahman, M.H. *et al.* Whole Exome Sequencing Identifies Candidate Genes Associated with Hereditary Predisposition to Uveal Melanoma. *Ophthalmology* **127**, 668-678 (2020).
83. Derrien, A.C. *et al.* Germline MBD4 mutations and predisposition to uveal melanoma. *J Natl Cancer Inst* (2020).
84. Nathan, V. *et al.* Loss-of-function variants in POT1 predispose to uveal melanoma. *J Med Genet* (2020).
85. Chattopadhyay, C. *et al.* Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* **122**, 2299-312 (2016).
86. Damato, E.M. & Damato, B.E. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients. *Ophthalmology* **119**, 1582-9 (2012).

87. Henderson, E. & Margo, C.E. Iris melanoma. *Arch Pathol Lab Med* **132**, 268-72 (2008).
88. Shields, C.L., Manalac, J., Das, C., Ferguson, K. & Shields, J.A. Choroidal melanoma: clinical features, classification, and top 10 pseudomelanomas. *Curr Opin Ophthalmol* **25**, 177-85 (2014).
89. Avery, R.B. *et al.* Histopathologic characteristics of choroidal melanoma in eyes enucleated after iodine 125 brachytherapy in the collaborative ocular melanoma study. *Arch Ophthalmol* **126**, 207-12 (2008).
90. Collaborative Ocular Melanoma Study, G. *et al.* Baseline echographic characteristics of tumors in eyes of patients enrolled in the Collaborative Ocular Melanoma Study: COMS report no. 29. *Ophthalmology* **115**, 1390-7, 1397 e1-2 (2008).
91. Kivela, T. Diagnosis of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol* **49**, 1-15 (2012).
92. Diener-West, M. *et al.* Screening for metastasis from choroidal melanoma: the Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report 23. *J Clin Oncol* **22**, 2438-44 (2004).
93. Kujala, E., Makitie, T. & Kivela, T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 4651-9 (2003).
94. Collaborative Ocular Melanoma Study, G. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15. *Arch Ophthalmol* **119**, 670-6 (2001).
95. Pons, F. *et al.* Metastatic uveal melanoma: is there a role for conventional chemotherapy? - A single center study based on 58 patients. *Melanoma Res* **21**, 217-22 (2011).
96. Gragoudas, E.S. *et al.* Survival of patients with metastases from uveal melanoma. *Ophthalmology* **98**, 383-9; discussion 390 (1991).
97. Lane, A.M., Kim, I.K. & Gragoudas, E.S. Survival Rates in Patients After Treatment for Metastasis From Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol* **136**, 981-986 (2018).
98. Mariani, P. *et al.* Radiofrequency ablation and surgical resection of liver metastases from uveal melanoma. *Eur J Surg Oncol* **42**, 706-12 (2016).
99. Moser, J.C. *et al.* The Mayo Clinic experience with the use of kinase inhibitors, ipilimumab, bevacizumab, and local therapies in the treatment of metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res* **25**, 59-63 (2015).

100. Amaro, A. *et al.* The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **36**, 109-140 (2017).
101. Ardjomand, N. *et al.* Lymph node metastases arising from uveal melanoma. *Wien Klin Wochenschr* **117**, 433-5 (2005).
102. Lorigan, J.G., Wallace, S. & Mavligit, G.M. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients. *AJR Am J Roentgenol* **157**, 1279-81 (1991).
103. Bakalian, S. *et al.* Molecular pathways mediating liver metastasis in patients with uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **14**, 951-6 (2008).
104. Scala, S. *et al.* CXC chemokine receptor 4 is expressed in uveal malignant melanoma and correlates with the epithelioid-mixed cell type. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1589-95 (2007).
105. Anastassiou, G. *et al.* Expression of Fas and Fas ligand in uveal melanoma: biological implication and prognostic value. *J Pathol* **194**, 466-72 (2001).
106. Eskelin, S. & Kivela, T. Imaging to detect metastases from malignant uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* **120**, 676 (2002).
107. Rietschel, P. *et al.* Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J Clin Oncol* **23**, 8076-80 (2005).
108. Mudhar, H.S. *et al.* A critical appraisal of the prognostic and predictive factors for uveal malignant melanoma. *Histopathology* **45**, 1-12 (2004).
109. Shields, C.L., Kaliki, S., Furuta, M., Mashayekhi, A. & Shields, J.A. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina* **32**, 1363-72 (2012).
110. Collaborative Ocular Melanoma Study, G. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. *Arch Ophthalmol* **124**, 1684-93 (2006).
111. Shields, C.L. *et al.* Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. *Arch Ophthalmol* **127**, 989-98 (2009).
112. Collaborative Ocular Melanoma Study, G. Comparison of clinical, echographic, and histopathological measurements from eyes with medium-sized choroidal melanoma in the collaborative ocular melanoma study: COMS report no. 21. *Arch Ophthalmol* **121**, 1163-71 (2003).
113. Shields, C.L. *et al.* American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category)

predicts prognosis in 7731 patients. *Ophthalmology* **120**, 2066-71 (2013).
114. Force, A.O.O.T. International Validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th Edition Classification of Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol* **133**, 376-83 (2015).
115. Manschot, W.A. & Van Peperzeel, H.A. Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Hum Pathol* **13**, 1147-8 (1982).
116. Singh, A.D., Shields, C.L. & Shields, J.A. Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res* **11**, 255-63 (2001).
117. Shields, C.L. *et al.* Iris melanoma: risk factors for metastasis in 169 consecutive patients. *Ophthalmology* **108**, 172-8 (2001).
118. Rummelt, V., Folberg, R., Woolson, R.F., Hwang, T. & Pe'er, J. Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas. *Ophthalmology* **102**, 844-51 (1995).
119. Seddon, J.M., Albert, D.M., Lavin, P.T. & Robinson, N. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* **101**, 1894-9 (1983).
120. Augsburger, J.J. & Gamel, J.W. Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma. *Cancer* **66**, 1596-600 (1990).
121. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 6. *Am J Ophthalmol* **125**, 745-66 (1998).
122. Coupland, S.E., Campbell, I. & Damato, B. Routes of extraocular extension of uveal melanoma: risk factors and influence on survival probability. *Ophthalmology* **115**, 1778-85 (2008).
123. Pach, J.M. *et al.* Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas with extrascleral extension. *Am J Ophthalmol* **101**, 325-31 (1986).
124. Singh, A.D. *et al.* Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with oculo(dermal) melanocytosis. *Ophthalmology* **105**, 195-8 (1998).
125. Shields, C.L. *et al.* Association of ocular and oculodermal melanocytosis with the rate of uveal melanoma metastasis: analysis of 7872 consecutive eyes. *JAMA Ophthalmol* **131**, 993-1003 (2013).
126. McLean, I.W., Foster, W.D., Zimmerman, L.E. & Gamel, J.W. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the

Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol* **96**, 502-9 (1983).
127. McLean, I.W., Foster, W.D., Zimmerman, L.E. & Gamel, J.W. Modifications of Callender's Classification of Uveal Melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol* **195**, lvi-lx (2018).
128. McLean, M.J., Foster, W.D. & Zimmerman, L.E. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* **95**, 48-58 (1977).
129. Mooy, C.M. *et al.* Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am J Pathol* **147**, 1097-104 (1995).
130. Karlsson, M. *et al.* Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. *Eur J Cancer* **32A**, 357-62 (1996).
131. Makitie, T., Summanen, P., Tarkkanen, A. & Kivela, T. Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2471-80 (1999).
132. Folberg, R. *et al.* The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: a matched case-control study. *Hum Pathol* **23**, 1298-305 (1992).
133. Bronkhorst, I.H. *et al.* Different subsets of tumor-infiltrating lymphocytes correlate with macrophage influx and monosomy 3 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 5370-8 (2012).
134. Bronkhorst, I.H. & Jager, M.J. Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment. *J Innate Immun* **4**, 454-62 (2012).
135. Herwig, M.C. & Grossniklaus, H.E. Role of macrophages in uveal melanoma. *Expert Rev Ophthalmol* **6**, 405-407 (2011).
136. Maat, W. *et al.* Monosomy of chromosome 3 and an inflammatory phenotype occur together in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 505-10 (2008).
137. Bande Rodriguez, M.F. *et al.* Blood Biomarkers of Uveal Melanoma: Current Perspectives. *Clin Ophthalmol* **14**, 157-169 (2020).
138. Pardo, M. *et al.* Proteome analysis of a human uveal melanoma primary cell culture by 2-DE and MS. *Proteomics* **5**, 4980-93 (2005).

139. Pardo, M. *et al.* The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker. *Int J Cancer* **119**, 1014-22 (2006).
140. Pardo, M. *et al.* Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum. *J Proteome Res* **6**, 2802-11 (2007).
141. Bande, M.F. *et al.* Serum DJ-1/PARK 7 is a potential biomarker of choroidal nevi transformation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 62-7 (2012).
142. Bande, M.F. *et al.* ME20-S as a Potential Biomarker for the Evaluation of Uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**, 7007-11 (2015).
143. Sisley, K. *et al.* Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* **19**, 22-8 (1997).
144. Damato, B. *et al.* Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology* **114**, 1925-31 (2007).
145. Abdel-Rahman, M.H. *et al.* Frequency, molecular pathology and potential clinical significance of partial chromosome 3 aberrations in uveal melanoma. *Mod Pathol* **24**, 954-62 (2011).
146. Sisley, K. *et al.* Non-random abnormalities of chromosomes 3, 6, and 8 associated with posterior uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **5**, 197-200 (1992).
147. Sisley, K. *et al.* Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosomes 3, 6, and 8. *Genes Chromosomes Cancer* **2**, 205-9 (1990).
148. Furney, S.J. *et al.* SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov* **3**, 1122-1129 (2013).
149. Harbour, J.W. *et al.* Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* **330**, 1410-3 (2010).
150. Field, M.G. & Harbour, J.W. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol* **25**, 234-9 (2014).
151. Yavuzyigitoglu, S. *et al.* Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations: A Distinct Subclass Associated with Late-Onset Metastases. *Ophthalmology* **123**, 1118-28 (2016).
152. Ewens, K.G. *et al.* Chromosome 3 status combined with BAP1 and EIF1AX mutation profiles are associated with metastasis in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 5160-7 (2014).

153. Li, Y., Jia, R. & Ge, S. Role of Epigenetics in Uveal Melanoma. *Int J Biol Sci* **13**, 426-433 (2017).
154. Chen, X. *et al.* Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 1193-9 (2011).
155. Robertson, A.G. *et al.* Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **32**, 204-220 e15 (2017).
156. Maat, W. *et al.* Epigenetic inactivation of RASSF1a in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 486-90 (2007).
157. Dratviman-Storobinsky, O. *et al.* The role of RASSF1A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 2611-9 (2012).
158. Field, M.G. *et al.* PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res* **22**, 1234-42 (2016).
159. Pardo, M. *et al.* Abnormal cell cycle regulation in primary human uveal melanoma cultures. *J Cell Biochem* **93**, 708-20 (2004).
160. Onken, M.D., Worley, L.A., Ehlers, J.P. & Harbour, J.W. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* **64**, 7205-9 (2004).
161. Harbour, J.W. A prognostic test to predict the risk of metastasis in uveal melanoma based on a 15-gene expression profile. *Methods Mol Biol* **1102**, 427-40 (2014).
162. Harbour, J.W. The genetics of uveal melanoma: an emerging framework for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 171-81 (2012).
163. Harbour, J.W. & Chao, D.L. A molecular revolution in uveal melanoma: implications for patient care and targeted therapy. *Ophthalmology* **121**, 1281-8 (2014).
164. Shields, C.L. *et al.* Plaque radiotherapy for uveal melanoma: long-term visual outcome in 1106 consecutive patients. *Arch Ophthalmol* **118**, 1219-28 (2000).
165. Damato, B., Patel, I., Campbell, I.R., Mayles, H.M. & Errington, R.D. Local tumor control after 106Ru brachytherapy of choroidal melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**, 385-91 (2005).
166. Wen, J.C., Oliver, S.C. & McCannel, T.A. Ocular complications following I-125 brachytherapy for choroidal melanoma. *Eye (Lond)* **23**, 1254-68 (2009).
167. Gragoudas, E.S., Lane, A.M., Munzenrider, J., Egan, K.M. & Li, W. Long-term risk of local failure after proton therapy for

choroidal/ciliary body melanoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* **100**, 43-8; discussion 48-9 (2002).

168. Desjardins, L. *et al.* Treatment of uveal melanoma by accelerated proton beam. *Dev Ophthalmol* **49**, 41-57 (2012).
169. Garcia-Arumi, J. *et al.* Endoresection technique with/without brachytherapy for management of high posterior choroidal melanoma: extended follow-up results. *Retina* **35**, 628-37 (2015).
170. Carvajal, R.D. *et al.* Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 2397-405 (2014).
171. Carvajal, R.D. *et al.* Selumetinib in Combination With Dacarbazine in Patients With Metastatic Uveal Melanoma: A Phase III, Multicenter, Randomized Trial (SUMIT). *J Clin Oncol* **36**, 1232-1239 (2018).
172. Ambrosini, G. *et al.* Identification of unique MEK-dependent genes in GNAQ mutant uveal melanoma involved in cell growth, tumor cell invasion, and MEK resistance. *Clin Cancer Res* **18**, 3552-61 (2012).
173. Heppt, M.V. *et al.* Prognostic factors and outcomes in metastatic uveal melanoma treated with programmed cell death-1 or combined PD-1/cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibition. *Eur J Cancer* **82**, 56-65 (2017).
174. Wessely, A. *et al.* The Role of Immune Checkpoint Blockade in Uveal Melanoma. *Int J Mol Sci* **21**(2020).
175. Zimmer, L. *et al.* Phase II DeCOG-study of ipilimumab in pretreated and treatment-naive patients with metastatic uveal melanoma. *PLoS One* **10**, e0118564 (2015).
176. Chandran, S.S. *et al.* Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* **18**, 792-802 (2017).
177. Krishna, Y., McCarthy, C., Kalirai, H. & Coupland, S.E. Inflammatory cell infiltrates in advanced metastatic uveal melanoma. *Hum Pathol* **66**, 159-166 (2017).
178. Angi, M. University of Liverpool (2015).
179. Singh, A.D., Shields, C.L., Shields, J.A. & De Potter, P. Bilateral primary uveal melanoma. Bad luck or bad genes? *Ophthalmology* **103**, 256-62 (1996).
180. Kiratli, H. & Bilgic, S. Sequential development of bilateral primary choroidal melanoma. *Acta Ophthalmol Scand* **78**, 474-6 (2000).

181. Wiesinger, H., Phipps, G.W. & Guerry, D., 3rd. Bilateral melanoma of the choroid associated with leukemia and meningioma. *Arch Ophthalmol* **62**, 889-93 (1959).
182. Shammas, H.F. & Watzke, R.C. Bilateral choroidal melanomas. Case report and incidence. *Arch Ophthalmol* **95**, 617-23 (1977).
183. Gonder, J.R., Shields, J.A., Shakin, J.L. & Albert, D.M. Bilateral ocular melanocytosis with malignant melanoma of the choroid. *Br J Ophthalmol* **65**, 843-5 (1981).
184. Migdal, C. & Macfarlane, A. Bilateral primary choroidal melanoma. *Br J Ophthalmol* **68**, 268-71 (1984).
185. Turaka, K., Shields, C.L., Shah, C.P., Say, E.A. & Shields, J.A. Bilateral uveal melanoma in an arc welder. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **249**, 141-4 (2011).
186. Scott, J.F. *et al.* Primary bilateral uveal melanoma: a population-based study and systematic review. *Clin Exp Ophthalmol* **46**, 502-510 (2018).
187. Qiu, M. & Shields, C.L. Choroidal Nevus in the United States Adult Population: Racial Disparities and Associated Factors in the National Health and Nutrition Examination Survey. *Ophthalmology* **122**, 2071-83 (2015).
188. Singh, A.D., Shields, C.L., Shields, J.A., Eagle, R.C. & De Potter, P. Uveal melanoma and familial atypical mole and melanoma (FAM-M) syndrome. *Ophthalmic Genet* **16**, 53-61 (1995).
189. Specht, C.S. & Smith, T.W. Uveal malignant melanoma and von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer* **62**, 812-7 (1988).
190. Honavar, S.G. *et al.* Two discrete choroidal melanomas in an eye with ocular melanocytosis. *Surv Ophthalmol* **47**, 36-41 (2002).
191. Shields, C.L., Masoomian, B. & Shields, J.A. Bilateral uveal melanoma: hunting for the source. *Clin Exp Ophthalmol* **46**, 459-461 (2018).
192. Houlston, R.S. & Damato, B.E. Genetic predisposition to ocular melanoma. *Eye (Lond)* **13 (Pt 1)**, 43-6 (1999).
193. Mullaney, J., Mooney, D., O'Connor, M. & McDonald, G.S. Bilateral ovarian carcinoma with bilateral uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* **68**, 261-7 (1984).
194. Kannengiesser, C. *et al.* CDKN2A as a uveal and cutaneous melanoma susceptibility gene. *Genes Chromosomes Cancer* **38**, 265-8 (2003).
195. Henkind, P. & Roth, M.S. Breast carcinoma and concurrent uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* **71**, 198-203 (1971).

196. Diener-West, M. *et al.* Second primary cancers after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: COMS Report No. 25. *Arch Ophthalmol* **123**, 601-4 (2005).
197. Singh, A.D. *et al.* Familial uveal melanoma. Clinical observations on 56 patients. *Arch Ophthalmol* **114**, 392-9 (1996).
198. Kodjikian, L. *et al.* Familial uveal melanoma: a report on two families and a review of the literature. *Acta Ophthalmol Scand* **81**, 389-95 (2003).
199. Abdel-Rahman, M.H., Pilarski, R., Ezzat, S., Sexton, J. & Davidorf, F.H. Cancer family history characterization in an unselected cohort of 121 patients with uveal melanoma. *Fam Cancer* **9**, 431-8 (2010).
200. Buecher, B. *et al.* Contribution of CDKN2A/P16 (INK4A), P14 (ARF), CDK4 and BRCA1/2 germline mutations in individuals with suspected genetic predisposition to uveal melanoma. *Fam Cancer* **9**, 663-7 (2010).
201. Hearle, N. *et al.* Contribution of germline mutations in BRCA2, P16(INK4A), P14(ARF) and P15 to uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 458-62 (2003).
202. Soufir, N. *et al.* Individuals with presumably hereditary uveal melanoma do not harbour germline mutations in the coding regions of either the P16INK4A, P14ARF or cdk4 genes. *Br J Cancer* **82**, 818-22 (2000).
203. Scott, R.J. *et al.* BRCA2 mutations in a population-based series of patients with ocular melanoma. *Int J Cancer* **102**, 188-91 (2002).
204. Sinilnikova, O.M. *et al.* Germline brca2 sequence variants in patients with ocular melanoma. *Int J Cancer* **82**, 325-8 (1999).
205. Johansson, P.A. *et al.* Evaluation of the contribution of germline variants in BRCA1 and BRCA2 to uveal and cutaneous melanoma. *Melanoma Res* **29**, 483-490 (2019).
206. Abdel-Rahman, M.H., Pilarski, R., Massengill, J.B., Christopher, B.B. & Davidorf, F.H. Lack of GNAQ germline mutations in uveal melanoma patients with high risk for hereditary cancer predisposition. *Fam Cancer* **10**, 319-21 (2011).
207. Metzelaar-Blok, J.A. *et al.* Characterization of melanocortin-1 receptor gene variants in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1951-4 (2001).
208. Yu, M.D., Masoomian, B., Shields, J.A. & Shields, C.L. BAP1 Germline Mutation Associated with Bilateral Primary Uveal Melanoma. *Ocul Oncol Pathol* **6**, 10-14 (2020).

209. Yu, H. *et al.* The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol* **30**, 5071-85 (2010).
210. Wang, A., Papneja, A., Hyrcza, M., Al-Habeeb, A. & Ghazarian, D. Gene of the month: BAP1. *J Clin Pathol* **69**, 750-3 (2016).
211. Masoomian, B., Shields, J.A. & Shields, C.L. Overview of BAP1 cancer predisposition syndrome and the relationship to uveal melanoma. *J Curr Ophthalmol* **30**, 102-109 (2018).
212. Ventii, K.H. *et al.* BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res* **68**, 6953-62 (2008).
213. Bononi, A. *et al.* Germline BAP1 mutations induce a Warburg effect. *Cell Death Differ* **24**, 1694-1704 (2017).
214. Gupta, M.P. *et al.* Clinical Characteristics of Uveal Melanoma in Patients With Germline BAP1 Mutations. *JAMA Ophthalmol* **133**, 881-7 (2015).
215. Rai, K. *et al.* Germline BAP1 alterations in familial uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **56**, 168-174 (2017).
216. Turunen, J.A. *et al.* BAP1 Germline Mutations in Finnish Patients with Uveal Melanoma. *Ophthalmology* **123**, 1112-7 (2016).
217. Battaglia, A. The Importance of Multidisciplinary Approach in Early Detection of BAP1 Tumor Predisposition Syndrome: Clinical Management and Risk Assessment. *Clin Med Insights Oncol* **8**, 37-47 (2014).
218. Walpole, S. *et al.* Comprehensive Study of the Clinical Phenotype of Germline BAP1 Variant-Carrying Families Worldwide. *J Natl Cancer Inst* **110**, 1328-1341 (2018).
219. Roushdy-Hammady, I., Siegel, J., Emri, S., Testa, J.R. & Carbone, M. Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey. *Lancet* **357**, 444-5 (2001).
220. Testa, J.R. *et al.* Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* **43**, 1022-5 (2011).
221. Wiesner, T. *et al.* Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet* **43**, 1018-21 (2011).
222. Njauw, C.N. *et al.* Germline BAP1 inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families. *PLoS One* **7**, e35295 (2012).
223. Pena-Llopis, S. *et al.* BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* **44**, 751-9 (2012).

224. Rai, K., Pilarski, R., Cebulla, C.M. & Abdel-Rahman, M.H. Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clin Genet* **89**, 285-94 (2016).
225. Carbone, M. *et al.* BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J Transl Med* **10**, 179 (2012).
226. Helgadottir, H. & Hoiom, V. The genetics of uveal melanoma: current insights. *Appl Clin Genet* **9**, 147-55 (2016).
227. Hoiom, V. *et al.* Hereditary uveal melanoma: a report of a germline mutation in BAP1. *Genes Chromosomes Cancer* **52**, 378-84 (2013).
228. Herlyn, M. & Nathanson, K.L. Taking the guesswork out of uveal melanoma. *N Engl J Med* **363**, 2256-7 (2010).
229. Cebulla, C.M. *et al.* Analysis of BAP1 Germline Gene Mutation in Young Uveal Melanoma Patients. *Ophthalmic Genet* **36**, 126-31 (2015).
230. Nielsen, M. *et al.* The genetic basis of uveal melanoma. *J Fr Ophtalmol* **38**, 516-21 (2015).
231. Kayser, M. *et al.* Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. *Am J Hum Genet* **82**, 411-23 (2008).
232. Liu, F. *et al.* Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol* **19**, R192-3 (2009).
233. Altshuler, D., Daly, M.J. & Lander, E.S. Genetic mapping in human disease. *Science* **322**, 881-8 (2008).
234. Yang, Y. *et al.* Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* **369**, 1502-11 (2013).
235. Rabbani, B., Mahdieh, N., Hosomichi, K., Nakaoka, H. & Inoue, I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* **57**, 621-32 (2012).
236. Reuter, J.A., Spacek, D.V. & Snyder, M.P. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* **58**, 586-97 (2015).
237. Jamuar, S.S. & Tan, E.C. Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Hum Genomics* **9**, 10 (2015).
238. Alekseyev, Y.O. *et al.* A Next-Generation Sequencing Primer-How Does It Work and What Can It Do? *Acad Pathol* **5**, 2374289518766521 (2018).
239. Daoud, H. *et al.* Next-generation sequencing for diagnosis of rare diseases in the neonatal intensive care unit. *CMAJ* **188**, E254-E260 (2016).

240. Saunders, C.J. *et al.* Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci Transl Med* **4**, 154ra135 (2012).
241. Bainbridge, M.N. *et al.* Whole-genome sequencing for optimized patient management. *Sci Transl Med* **3**, 87re3 (2011).
242. Powis, Z. *et al.* Clinical germline diagnostic exome sequencing for hereditary cancer: Findings within novel candidate genes are prevalent. *Cancer Genet* **224-225**, 12-20 (2018).
243. Jacob, H.J. *et al.* Genomics in clinical practice: lessons from the front lines. *Sci Transl Med* **5**, 194cm5 (2013).
244. Iglesias, A. *et al.* The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice. *Genet Med* **16**, 922-31 (2014).
245. Shashi, V. *et al.* The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med* **16**, 176-82 (2014).
246. Biesecker, L.G. & Green, R.C. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med* **371**, 1170 (2014).
247. Farwell Hagman, K.D. *et al.* Candidate-gene criteria for clinical reporting: diagnostic exome sequencing identifies altered candidate genes among 8% of patients with undiagnosed diseases. *Genet Med* **19**, 224-235 (2017).
248. Smith, E.D. *et al.* Classification of Genes: Standardized Clinical Validity Assessment of Gene-Disease Associations Aids Diagnostic Exome Analysis and Reclassifications. *Hum Mutat* **38**, 600-608 (2017).
249. LaDuca, H. *et al.* Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genet Med* **16**, 830-7 (2014).
250. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **17**, 405-24 (2015).
251. Quang, D., Chen, Y. & Xie, X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* **31**, 761-3 (2015).
252. Ioannidis, N.M. *et al.* REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet* **99**, 877-885 (2016).
253. Amendola, L.M. *et al.* Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical

Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet* **98**, 1067-1076 (2016).
254. Cooper, D.N. *et al.* Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat* **31**, 631-55 (2010).
255. Chong, J.X. *et al.* The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet* **97**, 199-215 (2015).
256. Tennessen, J.A. *et al.* Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* **337**, 64-9 (2012).
257. Veltman, J.A. & Brunner, H.G. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **13**, 565-75 (2012).
258. Landrum, M.J. *et al.* ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* **42**, D980-5 (2014).
259. Strande, N.T. *et al.* Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet* **100**, 895-906 (2017).
260. Stenson, P.D. *et al.* Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* **21**, 577-81 (2003).
261. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, J.H.U.B., MD). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. (World Wide Web URL: https://omim.org/, 2021).
262. Stenson, P.D. *et al.* The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* **136**, 665-677 (2017).
263. Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G.M., Shendure, J. & Kircher, M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* **47**, D886-D894 (2019).
264. Kopanos, C. *et al.* VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* **35**, 1978-1980 (2019).
265. Kohler, S. *et al.* The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Res* **49**, D1207-D1217 (2021).
266. UniProt, C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* **47**, D506-D515 (2019).
267. Forbes, S.A. *et al.* COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* **43**, D805-11 (2015).

268. McGee, R.B. & Nichols, K.E. Introduction to cancer genetic susceptibility syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2016**, 293-301 (2016).
269. Cruz, C., Teule, A., Caminal, J.M., Blanco, I. & Piulats, J.M. Uveal melanoma and BRCA1/BRCA2 genes: a relationship that needs further investigation. *J Clin Oncol* **29**, e827-9 (2011).
270. Iscovich, J. *et al.* Prevalence of the BRCA2 6174 del T mutation in Israeli uveal melanoma patients. *Int J Cancer* **98**, 42-4 (2002).
271. Lobo, J. *et al.* Ovarian metastasis from uveal melanoma with MLH1/PMS2 protein loss in a patient with germline MLH1 mutated Lynch syndrome: consequence or coincidence? *Virchows Arch* **470**, 347-352 (2017).
272. Marous, C.L., Marous, M.R., Welch, R.J., Shields, J.A. & Shields, C.L. Choroidal Melanoma, Sector Melanocytosis, and Retinal Pigment Epithelial Microdetachments in Birt-Hogg-Dube Syndrome. *Retin Cases Brief Rep* **13**, 202-206 (2019).
273. Fontcuberta, I.C., Salomao, D.R., Quiram, P.A. & Pulido, J.S. Choroidal melanoma and lid fibrofoliculomas in Birt-Hogg-Dube syndrome. *Ophthalmic Genet* **32**, 143-6 (2011).
274. Johansson, P.A. *et al.* Prolonged stable disease in a uveal melanoma patient with germline MBD4 nonsense mutation treated with pembrolizumab and ipilimumab. *Immunogenetics* **71**, 433-436 (2019).
275. Baglietto, L. *et al.* Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* **102**, 193-201 (2010).
276. Leachman, S.A. *et al.* Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **36**, 77-90 (2017).
277. Duan, Z. *et al.* DNA repair gene XRCC3 241Met variant is not associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1142-3 (2002).
278. Jacobsen, N.R. *et al.* No association between the DNA repair gene XRCC3 T241M polymorphism and risk of skin cancer and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 584-5 (2003).
279. Kheir, W.J., Kim, J.S. & Materin, M.A. Multiple Uveal Melanoma. *Ocul Oncol Pathol* **6**, 368-375 (2020).
280. Rahman, N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature* **505**, 302-8 (2014).
281. Passamonti, F. & Rumi, E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica* **94**, 7-10 (2009).

282. Goldin, L.R., Bjorkholm, M., Kristinsson, S.Y., Samuelsson, J. & Landgren, O. Germline and somatic JAK2 mutations and susceptibility to chronic myeloproliferative neoplasms. *Genome Med* **1**, 55 (2009).
283. Aoude, L.G. *et al.* Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J Natl Cancer Inst* **107**(2015).
284. Aoude, L.G., Wadt, K.A., Pritchard, A.L. & Hayward, N.K. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**, 148-60 (2015).
285. Pelttari, L.M. *et al.* A Finnish founder mutation in RAD51D: analysis in breast, ovarian, prostate, and colorectal cancer. *J Med Genet* **49**, 429-32 (2012).
286. de Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**, 2100-10 (2005).
287. Calvete, O. *et al.* The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur J Hum Genet* **25**, 1278-1281 (2017).
288. Kilic, E. *et al.* Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3703-7 (2006).
289. Xiong, D. *et al.* A recurrent mutation in PARK2 is associated with familial lung cancer. *Am J Hum Genet* **96**, 301-8 (2015).
290. Gong, Y. *et al.* Pan-cancer genetic analysis identifies PARK2 as a master regulator of G1/S cyclins. *Nat Genet* **46**, 588-94 (2014).
291. Cesari, R. *et al.* Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5956-61 (2003).
292. Aalto, Y., Eriksson, L., Seregard, S., Larsson, O. & Knuutila, S. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 313-7 (2001).
293. Sriram, S.R. *et al.* Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Hum Mol Genet* **14**, 2571-86 (2005).
294. Cookson, M.R. *et al.* RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein. *Hum Mol Genet* **12**, 2957-65 (2003).
295. Olsen, J.H. *et al.* Atypical cancer pattern in patients with Parkinson's disease. *Br J Cancer* **92**, 201-5 (2005).

296. Tanaka, A. *et al.* Germline mutation in ATR in autosomal- dominant oropharyngeal cancer syndrome. *Am J Hum Genet* **90**, 511-7 (2012).
297. Vineis, P. *et al.* A field synopsis on low-penetrance variants in DNA repair genes and cancer susceptibility. *J Natl Cancer Inst* **101**, 24-36 (2009).
298. O'Driscoll, M. & Jeggo, P.A. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* **7**, 45-54 (2006).
299. Warmerdam, D.O. & Kanaar, R. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutat Res* **704**, 2-11 (2010).
300. Kashyap, S. *et al.* DNA damage response proteins and its role in tumor progression of uveal melanoma with patient outcome. *Clin Transl Oncol* **22**, 1472-1480 (2020).
301. Fishilevich, S. *et al.* GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database (Oxford)* **2017**(2017).
302. Wei, M.C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-30 (2001).
303. Barlow, J.W. *et al.* Germ line BAX alterations are infrequent in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 1403-6 (2004).
304. Silva, A.G. *et al.* Germline BAX deletion in a patient with melanoma and gastrointestinal stromal tumor. *Am J Gastroenterol* **108**, 1372-5 (2013).
305. Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J.C. & Perucho, M. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10872-7 (2000).
306. Sermadiras, S. *et al.* Expression of Bcl-2 and Bax in cultured normal human keratinocytes and melanocytes: relationship to differentiation and melanogenesis. *Br J Dermatol* **137**, 883-9 (1997).
307. Chinnadurai, G. CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminaries. *Biochim Biophys Acta* **1765**, 67-73 (2006).
308. Bonache, S. *et al.* Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol* **144**, 2495-2513 (2018).
309. Zarrizi, R. *et al.* Germline RBBP8 variants associated with early-onset breast cancer compromise replication fork stability. *J Clin Invest* **130**, 4069-4080 (2020).

310. Brantley, M.A., Jr. & Harbour, J.W. Inactivation of retinoblastoma protein in uveal melanoma by phosphorylation of sites in the COOH-terminal region. *Cancer Res* **60**, 4320-3 (2000).
311. Coupland, S.E. *et al.* Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* **82**, 961-70 (1998).
312. Uhlen, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
313. Onken, M.D., Worley, L.A. & Harbour, J.W. A metastasis modifier locus on human chromosome 8p in uveal melanoma identified by integrative genomic analysis. *Clin Cancer Res* **14**, 3737-45 (2008).
314. Knudson, A.G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-3 (1971).
315. Hawkins, G.A. *et al.* Germline sequence variants of the LZTS1 gene are associated with prostate cancer risk. *Cancer Genet Cytogenet* **137**, 1-7 (2002).
316. Heussen, F.M., Coupland, S.E., Kalirai, H., Damato, B.E. & Heimann, H. Non-ocular primary malignancies in patients with uveal melanoma: the Liverpool experience. *Br J Ophthalmol* **100**, 356-9 (2016).
317. Alfaar, A.S. *et al.* Uveal melanoma-associated cancers revisited. *ESMO Open* **5**(2020).
318. Soares, E. & Zhou, H. Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease. *Cell Mol Life Sci* **75**, 1179-1190 (2018).
319. Kohler, S. *et al.* Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res* **47**, D1018-D1027 (2019).
320. Gonfloni, S., Caputo, V. & Iannizzotto, V. P63 in health and cancer. *Int J Dev Biol* **59**, 87-93 (2015).
321. Fisher, M.L., Balinth, S. & Mills, A.A. p63-related signaling at a glance. *J Cell Sci* **133**(2020).
322. Awais, R., Spiller, D.G., White, M.R. & Paraoan, L. p63 is required beside p53 for PERP-mediated apoptosis in uveal melanoma. *Br J Cancer* **115**, 983-992 (2016).
323. Berger, M.F. *et al.* Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* **485**, 502-6 (2012).
324. Koopmans, A.E. *et al.* Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Mod Pathol* **27**, 1321-30 (2014).

325. Fahed, A.C. *et al.* Polygenic background modifies penetrance of monogenic variants for tier 1 genomic conditions. *Nat Commun* **11**, 3635 (2020).
326. Nusliha, A., Dalpatadu, U., Amarasinghe, B., Chandrasinghe, P.C. & Deen, K.I. Congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium (CHRPE) in patients with familial adenomatous polyposis (FAP); a polyposis registry experience. *BMC Res Notes* **7**, 734 (2014).
327. Takata, K. *et al.* Conserved overlapping gene arrangement, restricted expression, and biochemical activities of DNA polymerase nu (POLN). *J Biol Chem* **290**, 24278-93 (2015).
328. Lange, S.S., Takata, K. & Wood, R.D. DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 96-110 (2011).
329. Isidori, F. *et al.* RASAL1 and ROS1 Gene Variants in Hereditary Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **12**(2020).
330. Wu, J. *et al.* Prevalence of comprehensive DNA damage repair gene germline mutations in Chinese prostate cancer patients. *Int J Cancer* **148**, 673-681 (2021).
331. Liang, X.S. *et al.* Genetic variants in DNA repair genes and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with/without CDKN2A mutations. *Int J Cancer* **130**, 2062-6 (2012).
332. Gohler, T., Sabbioneda, S., Green, C.M. & Lehmann, A.R. ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase eta is needed for efficient recovery from UV damage. *J Cell Biol* **192**, 219-27 (2011).
333. Suhasini, A.N. & Brosh, R.M., Jr. Disease-causing missense mutations in human DNA helicase disorders. *Mutat Res* **752**, 138-152 (2013).
334. Damato, B., Dopierala, J.A. & Coupland, S.E. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Cancer Res* **16**, 6083-92 (2010).
335. Sisley, K. *et al.* Clinical applications of chromosome analysis, from fine needle aspiration biopsies, of posterior uveal melanomas. *Eye (Lond)* **12 (Pt 2)**, 203-7 (1998).
336. Augsburger, J.J. *et al.* Diagnostic transvitreal fine-needle aspiration biopsy of small melanocytic choroidal tumors in nevus versus melanoma category. *Trans Am Ophthalmol Soc* **100**, 225-32; discussion 232-4 (2002).
337. Cohen, V.M., Dinakaran, S., Parsons, M.A. & Rennie, I.G. Transvitreal fine needle aspiration biopsy: the influence of intraocular lesion size on diagnostic biopsy result. *Eye (Lond)* **15**, 143-7 (2001).

338. Maat, W. *et al.* The heterogeneous distribution of monosomy 3 in uveal melanomas: implications for prognostication based on fine-needle aspiration biopsies. *Arch Pathol Lab Med* **131**, 91-6 (2007).
339. Bronkhorst, I.H. *et al.* Effect of heterogeneous distribution of monosomy 3 on prognosis in uveal melanoma. *Arch Pathol Lab Med* **135**, 1042-7 (2011).
340. Mensink, H.W. *et al.* Chromosome 3 intratumor heterogeneity in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 500-4 (2009).
341. Midena, E. *et al.* In vivo monosomy 3 detection of posterior uveal melanoma: 3-year follow-up. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **246**, 609-14 (2008).
342. Caminal, J.M. *et al.* Epibulbar seeding at the site of a transvitreal fine-needle aspiration biopsy. *Arch Ophthalmol* **124**, 587-9 (2006).
343. Horsman, D.E., Sroka, H., Rootman, J. & White, V.A. Monosomy 3 and isochromosome 8q in a uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* **45**, 249-53 (1990).
344. Prescher, G., Bornfeld, N. & Becher, R. Nonrandom chromosomal abnormalities in primary uveal melanoma. *J Natl Cancer Inst* **82**, 1765-9 (1990).
345. Prescher, G., Bornfeld, N., Horsthemke, B. & Becher, R. Chromosomal aberrations defining uveal melanoma of poor prognosis. *Lancet* **339**, 691-2 (1992).
346. Prescher, G. *et al.* Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* **347**, 1222-5 (1996).
347. van den Bosch, T. *et al.* Higher percentage of FISH-determined monosomy 3 and 8q amplification in uveal melanoma cells relate to poor patient prognosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 2668-74 (2012).
348. van den Bosch, T., Kilic, E., Paridaens, D. & de Klein, A. Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind? *Dermatol Res Pract* **2010**, 360136 (2010).
349. Thomas, S. *et al.* Prognostic significance of chromosome 3 alterations determined by microsatellite analysis in uveal melanoma: a long-term follow-up study. *Br J Cancer* **106**, 1171-6 (2012).
350. Tschentscher, F. *et al.* Partial deletions of the long and short arm of chromosome 3 point to two tumor suppressor genes in uveal melanoma. *Cancer Res* **61**, 3439-42 (2001).
351. Rodrigues, M. *et al.* Association of Partial Chromosome 3 Deletion in Uveal Melanomas With Metastasis-Free Survival. *JAMA Ophthalmol* **138**, 182-188 (2020).

352. Shields, C.L. *et al.* Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. *Ophthalmology* **118**, 396-401 (2011).
353. White, V.A., McNeil, B.K. & Horsman, D.E. Acquired homozygosity (isodisomy) of chromosome 3 in uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* **102**, 40-5 (1998).
354. Onken, M.D. *et al.* Loss of heterozygosity of chromosome 3 detected with single nucleotide polymorphisms is superior to monosomy 3 for predicting metastasis in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **13**, 2923-7 (2007).
355. Kilic, E. *et al.* Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 2253-7 (2005).
356. Sisley, K. *et al.* Association of specific chromosome alterations with tumour phenotype in posterior uveal melanoma. *Br J Cancer* **82**, 330-8 (2000).
357. Damato, B. *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification of uveal melanoma: correlation with metastatic death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 3048-55 (2009).
358. White, V.A., Chambers, J.D., Courtright, P.D., Chang, W.Y. & Horsman, D.E. Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer* **83**, 354-9 (1998).
359. Coupland, S.E., Lake, S.L., Zeschnigk, M. & Damato, B.E. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond)* **27**, 230-42 (2013).
360. Ehlers, J.P., Worley, L., Onken, M.D. & Harbour, J.W. Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **14**, 115-22 (2008).
361. Caines, R. *et al.* Cluster analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification data in choroidal melanoma. *Mol Vis* **21**, 1-11 (2015).
362. Cassoux, N. *et al.* Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* **98**, 769-74 (2014).
363. Scholes, A.G. *et al.* Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1008-11 (2003).
364. Parrella, P., Caballero, O.L., Sidransky, D. & Merbs, S.L. Detection of c-myc amplification in uveal melanoma by fluorescent in situ hybridization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1679-84 (2001).

365. Ewens, K.G. *et al.* Genomic profile of 320 uveal melanoma cases: chromosome 8p-loss and metastatic outcome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 5721-9 (2013).
366. Trolet, J. *et al.* Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 2572-80 (2009).
367. Harbour, J.W. Molecular prognostic testing and individualized patient care in uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* **148**, 823-9 e1 (2009).
368. Dopierala, J., Damato, B.E., Lake, S.L., Taktak, A.F. & Coupland, S.E. Genetic heterogeneity in uveal melanoma assessed by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 4898-905 (2010).
369. Onken, M.D., Worley, L.A., Tuscan, M.D. & Harbour, J.W. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J Mol Diagn* **12**, 461-8 (2010).
370. Augsburger, J.J., Correa, Z.M. & Augsburger, B.D. Frequency and implications of discordant gene expression profile class in posterior uveal melanomas sampled by fine needle aspiration biopsy. *Am J Ophthalmol* **159**, 248-56 (2015).
371. Harbour, J.W. & Chen, R. The DecisionDx-UM Gene Expression Profile Test Provides Risk Stratification and Individualized Patient Care in Uveal Melanoma. *PLoS Curr* **5**(2013).
372. Afshar, A.R. *et al.* Next-Generation Sequencing of Uveal Melanoma for Detection of Genetic Alterations Predicting Metastasis. *Transl Vis Sci Technol* **8**, 18 (2019).
373. Angi, M. *et al.* Prognostic biopsy of choroidal melanoma: an optimised surgical and laboratory approach. *Br J Ophthalmol* **101**, 1143-1146 (2017).
374. Coupland, S.E. *et al.* Concordant chromosome 3 results in paired choroidal melanoma biopsies and subsequent tumour resection specimens. *Br J Ophthalmol* **99**, 1444-50 (2015).
375. Shields, C.L. *et al.* Cytogenetic Abnormalities in Uveal Melanoma Based on Tumor Features and Size in 1059 Patients: The 2016 W. Richard Green Lecture. *Ophthalmology* **124**, 609-618 (2017).
376. Damato, B. & Coupland, S.E. Translating uveal melanoma cytogenetics into clinical care. *Arch Ophthalmol* **127**, 423-9 (2009).

377. Shields, J.A., Shields, C.L., Materin, M., Sato, T. & Ganguly, A. Role of cytogenetics in management of uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* **126**, 416-9 (2008).
378. Cross, N.A. *et al.* Multiple locations on chromosome 3 are the targets of specific deletions in uveal melanoma. *Eye (Lond)* **20**, 476-81 (2006).
379. Parrella, P., Fazio, V.M., Gallo, A.P., Sidransky, D. & Merbs, S.L. Fine mapping of chromosome 3 in uveal melanoma: identification of a minimal region of deletion on chromosomal arm 3p25.1-p25.2. *Cancer Res* **63**, 8507-10 (2003).
380. Versluis, M. *et al.* Digital PCR validates 8q dosage as prognostic tool in uveal melanoma. *PLoS One* **10**, e0116371 (2015).
381. Parrella, P., Sidransky, D. & Merbs, S.L. Allelotype of posterior uveal melanoma: implications for a bifurcated tumor progression pathway. *Cancer Res* **59**, 3032-7 (1999).
382. Shields, C.L. *et al.* Chromosome 3 analysis of uveal melanoma using fine-needle aspiration biopsy at the time of plaque radiotherapy in 140 consecutive cases. *Trans Am Ophthalmol Soc* **105**, 43-52; discussion 52-3 (2007).
383. Desjardins, L. *et al.* [Prognostic factors for malignant uveal melanoma. Retrospective study on 2,241 patients and recent contribution of monosomy-3 research]. *J Fr Ophtalmol* **29**, 741-9 (2006).
384. Hou, C. *et al.* Mutations of GNAQ, GNA11, SF3B1, EIF1AX, PLCB4 and CYSLTR in Uveal Melanoma in Chinese Patients. *Ophthalmic Res* **63**, 358-368 (2020).
385. Martin, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet* **45**, 933-6 (2013).
386. Smit, K.N. *et al.* Combined mutation and copy-number variation detection by targeted next-generation sequencing in uveal melanoma. *Mod Pathol* **31**, 763-771 (2018).
387. Thornton, S. *et al.* Targeted Next-Generation Sequencing of 117 Routine Clinical Samples Provides Further Insights into the Molecular Landscape of Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)* **12**(2020).
388. Shields, C.L. *et al.* Small choroidal melanoma with chromosome 3 monosomy on fine-needle aspiration biopsy. *Ophthalmology* **114**, 1919-24 (2007).

389. Hoglund, M. *et al.* Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer* **108**, 57-65 (2004).
390. Hausler, T. *et al.* Loss of heterozygosity of 1p in uveal melanomas with monosomy 3. *Int J Cancer* **116**, 909-13 (2005).
391. Eskelin, S., Pyrhonen, S., Summanen, P., Hahka-Kemppinen, M. & Kivela, T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* **107**, 1443-9 (2000).
392. Singh, A.D. *et al.* Fine-needle aspiration biopsy of uveal melanoma: outcomes and complications. *Br J Ophthalmol* **100**, 456-62 (2016).
393. Singh, A.D. *et al.* Chromosome 3 status in uveal melanoma: a comparison of fluorescence in situ hybridization and single-nucleotide polymorphism array. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 3331-9 (2012).
394. Silva-Rodriguez, P. *et al.* Local recurrence of uveal melanoma after proton beam therapy. *Clin Exp Optom* **103**, 548-549 (2020).
395. Frizziero, L. *et al.* Uveal Melanoma Biopsy: A Review. *Cancers (Basel)* **11**(2019).
396. Callejo, S.A., Antecka, E., Blanco, P.L., Edelstein, C. & Burnier, M.N., Jr. Identification of circulating malignant cells and its correlation with prognostic factors and treatment in uveal melanoma. A prospective longitudinal study. *Eye (Lond)* **21**, 752-9 (2007).
397. (!!! INVALID CITATION !!!).
398. Jennings, L.J. *et al.* Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* **19**, 341-365 (2017).
399. Johansson, P. *et al.* Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4. *Oncotarget* **7**, 4624-31 (2016).
400. Cancer Genome Atlas, N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **161**, 1681-96 (2015).
401. Rimoldi, D. *et al.* Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* **63**, 5712-5 (2003).
402. Weber, A. *et al.* Absence of mutations of the BRAF gene and constitutive activation of extracellular-regulated kinase in malignant melanomas of the uvea. *Lab Invest* **83**, 1771-6 (2003).
403. Cruz, F., 3rd *et al.* Absence of BRAF and NRAS mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* **63**, 5761-6 (2003).

404. Chana, J.S. *et al.* c-myc, p53, and Bcl-2 expression and clinical outcome in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* **83**, 110-4 (1999).
405. Sun, Y., Tran, B.N., Worley, L.A., Delston, R.B. & Harbour, J.W. Functional analysis of the p53 pathway in response to ionizing radiation in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 1561-4 (2005).
406. Coupland, S.E. *et al.* The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. *J Pathol* **191**, 120-6 (2000).
407. Babchia, N., Calipel, A., Mouriaux, F., Faussat, A.M. & Mascarelli, F. The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K signaling pathways in human uveal melanoma cells: interaction with B-Raf/ERK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 421-9 (2010).
408. Denhardt, D.T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* **318 (Pt 3)**, 729-47 (1996).
409. Populo, H., Soares, P., Rocha, A.S., Silva, P. & Lopes, J.M. Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Res* **20**, 107-17 (2010).
410. Ye, M. *et al.* Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in hepatocyte growth factor-induced migration of uveal melanoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 497-504 (2008).
411. Abdel-Rahman, M.H. *et al.* High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *J Clin Oncol* **24**, 288-95 (2006).
412. Zuidervaart, W. *et al.* Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. *Br J Cancer* **92**, 2032-8 (2005).
413. Pache, M. *et al.* Sequence analysis and high-throughput immunohistochemical profiling of KIT (CD 117) expression in uveal melanoma using tissue microarrays. *Virchows Arch* **443**, 741-4 (2003).
414. Mooy, C.M. *et al.* No N-ras mutations in human uveal melanoma: the role of ultraviolet light revisited. *Br J Cancer* **64**, 411-3 (1991).
415. Soparker, C.N., O'Brien, J.M. & Albert, D.M. Investigation of the role of the ras protooncogene point mutation in human uveal melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 2203-9 (1993).
416. Onken, M.D. *et al.* Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 5230-4 (2008).

417. Van Raamsdonk, C.D. *et al.* Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**, 599-602 (2009).
418. Boru, G. *et al.* Heterogeneity in Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway Activation in Uveal Melanoma With Somatic GNAQ and GNA11 Mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 2474-2480 (2019).
419. Kusters-Vandevelde, H.V.N. *et al.* Whole-exome sequencing of a meningeal melanocytic tumour reveals activating CYSLTR2 and EIF1AX hotspot mutations and similarities to uveal melanoma. *Brain Tumor Pathol* **35**, 127-130 (2018).
420. Moore, A.R. *et al.* Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. *Nat Genet* **48**, 675-80 (2016).
421. Romano, E., Schwartz, G.K., Chapman, P.B., Wolchock, J.D. & Carvajal, R.D. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol* **12**, 913-22 (2011).
422. Royer-Bertrand, B. *et al.* Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing. *Am J Hum Genet* **99**, 1190-1198 (2016).
423. Bakhoum, M.F. & Esmaeli, B. Molecular Characteristics of Uveal Melanoma: Insights from the Cancer Genome Atlas (TCGA) Project. *Cancers (Basel)* **11**(2019).
424. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, pl1 (2013).
425. Vader, M.J.C. *et al.* GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi. *Br J Cancer* **117**, 884-887 (2017).
426. Markby, D.W., Onrust, R. & Bourne, H.R. Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science* **262**, 1895-901 (1993).
427. Van Raamsdonk, C.D., Fitch, K.R., Fuchs, H., de Angelis, M.H. & Barsh, G.S. Effects of G-protein mutations on skin color. *Nat Genet* **36**, 961-8 (2004).
428. Shoushtari, A.N. & Carvajal, R.D. GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma. *Melanoma Res* **24**, 525-34 (2014).
429. Mouti, M.A., Dee, C., Coupland, S.E. & Hurlstone, A.F. Minimal contribution of ERK1/2-MAPK signalling towards the maintenance of oncogenic GNAQQ209P-driven uveal melanomas in zebrafish. *Oncotarget* **7**, 39654-39670 (2016).

430. Yu, F.X. *et al.* Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer Cell* **25**, 822-30 (2014).
431. Feng, X. *et al.* Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* **25**, 831-45 (2014).
432. Lyon, A.M. & Tesmer, J.J. Structural insights into phospholipase C-beta function. *Mol Pharmacol* **84**, 488-500 (2013).
433. Hodis, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251-63 (2012).
434. Blasi, M.A. *et al.* 3p13 region: a possible location of a tumor suppressor gene involved in uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* **108**, 81-3 (1999).
435. van de Nes, J.A. *et al.* Comparing the Prognostic Value of BAP1 Mutation Pattern, Chromosome 3 Status, and BAP1 Immunohistochemistry in Uveal Melanoma. *Am J Surg Pathol* **40**, 796-805 (2016).
436. Shah, A.A., Bourne, T.D. & Murali, R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. *Pathology* **45**, 651-6 (2013).
437. van Essen, T.H. *et al.* Prognostic parameters in uveal melanoma and their association with BAP1 expression. *Br J Ophthalmol* **98**, 1738-43 (2014).
438. Kalirai, H., Dodson, A., Faqir, S., Damato, B.E. & Coupland, S.E. Lack of BAP1 protein expression in uveal melanoma is associated with increased metastatic risk and has utility in routine prognostic testing. *Br J Cancer* **111**, 1373-80 (2014).
439. Koopmans, A.E. *et al.* Patient survival in uveal melanoma is not affected by oncogenic mutations in GNAQ and GNA11. *Br J Cancer* **109**, 493-6 (2013).
440. Matatall, K.A. *et al.* BAP1 deficiency causes loss of melanocytic cell identity in uveal melanoma. *BMC Cancer* **13**, 371 (2013).
441. Field, M.G. *et al.* BAP1 Loss Is Associated with DNA Methylomic Repatterning in Highly Aggressive Class 2 Uveal Melanomas. *Clin Cancer Res* **25**, 5663-5673 (2019).
442. Golas, M.M., Sander, B., Will, C.L., Luhrmann, R. & Stark, H. Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. *Science* **300**, 980-4 (2003).

443. Harbour, J.W. *et al.* Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nat Genet* **45**, 133-5 (2013).
444. Battiste, J.L., Pestova, T.V., Hellen, C.U. & Wagner, G. The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Mol Cell* **5**, 109-19 (2000).
445. Johnson, C.P. *et al.* Systematic genomic and translational efficiency studies of uveal melanoma. *PLoS One* **12**, e0178189 (2017).
446. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-54 (2002).
447. Pollock, P.M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**, 19-20 (2003).
448. Richtig, G. *et al.* Beyond the BRAF(V)(600E) hotspot: biology and clinical implications of rare BRAF gene mutations in melanoma patients. *Br J Dermatol* **177**, 936-944 (2017).
449. Cohen, Y. *et al.* Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 2876-8 (2003).
450. Henriquez, F., Janssen, C., Kemp, E.G. & Roberts, F. The T1799A BRAF mutation is present in iris melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 4897-900 (2007).
451. Silva-Rodriguez, P. *et al.* Role of somatic mutations and chromosomal aberrations in the prognosis of uveal melanoma in a Spanish patient cohort. *Acta Ophthalmol* (2021).
452. Decatur, C.L. *et al.* Driver Mutations in Uveal Melanoma: Associations With Gene Expression Profile and Patient Outcomes. *JAMA Ophthalmol* **134**, 728-33 (2016).
453. Strom, S.P. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med* **13**, 3-11 (2016).
454. Lawrence, M.S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**, 214-218 (2013).
455. Luke, J.J. *et al.* Clinical activity of ipilimumab for metastatic uveal melanoma: a retrospective review of the Dana-Farber Cancer Institute, Massachusetts General Hospital, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, and University Hospital of Lausanne experience. *Cancer* **119**, 3687-95 (2013).
456. Kennedy, S. *et al.* An insight into the molecular genetics of a uveal melanoma patient cohort. *J Cancer Res Clin Oncol* **144**, 1861-1868 (2018).

457. Psinakis, F. *et al.* Uveal Melanoma: GNAQ and GNA11 Mutations in a Greek Population. *Anticancer Res* **37**, 5719-5726 (2017).
458. Xu, X. *et al.* Oncogenic GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma in Chinese. *PLoS One* **9**, e109699 (2014).
459. Drabarek, W. *et al.* Multi-Modality Analysis Improves Survival Prediction in Enucleated Uveal Melanoma Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 3595-3605 (2019).
460. Piaggio, F. *et al.* Secondary Somatic Mutations in G-Protein-Related Pathways and Mutation Signatures in Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)* **11**(2019).
461. Durante, M.A. *et al.* Genomic evolution of uveal melanoma arising in ocular melanocytosis. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* **5**(2019).
462. Moller, I. *et al.* Activating cysteinyl leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) mutations in blue nevi. *Mod Pathol* **30**, 350-356 (2017).
463. Pilarski, R. *et al.* Expanding the clinical phenotype of hereditary BAP1 cancer predisposition syndrome, reporting three new cases. *Genes Chromosomes Cancer* **53**, 177-82 (2014).
464. Lykke-Andersen, S. & Jensen, T.H. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 665-77 (2015).
465. Bertelsen, B. *et al.* High frequency of pathogenic germline variants within homologous recombination repair in patients with advanced cancer. *NPJ Genom Med* **4**, 13 (2019).
466. Fachal, L. & Dunning, A.M. From candidate gene studies to GWAS and post-GWAS analyses in breast cancer. *Curr Opin Genet Dev* **30**, 32-41 (2015).
467. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-58 (2013).
468. Cancer Genome Atlas Research, N. *et al.* The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* **45**, 1113-20 (2013).
469. Horak, P., Frohling, S. & Glimm, H. Integrating next-generation sequencing into clinical oncology: strategies, promises and pitfalls. *ESMO Open* **1**, e000094 (2016).
470. Lieb, M. *et al.* Psychosocial impact of prognostic genetic testing in uveal melanoma patients: a controlled prospective clinical observational study. *BMC Psychol* **8**, 8 (2020).
471. Cook, S.A., Damato, B., Marshall, E. & Salmon, P. Psychological aspects of cytogenetic testing of uveal melanoma: preliminary

findings and directions for future research. *Eye (Lond)* **23**, 581-5 (2009).
472. Aronow, M.E., Topham, A.K. & Singh, A.D. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013). *Ocul Oncol Pathol* **4**, 145-151 (2018).
473. Schank, T.E. & Hassel, J.C. Immunotherapies for the Treatment of Uveal Melanoma-History and Future. *Cancers (Basel)* **11**(2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

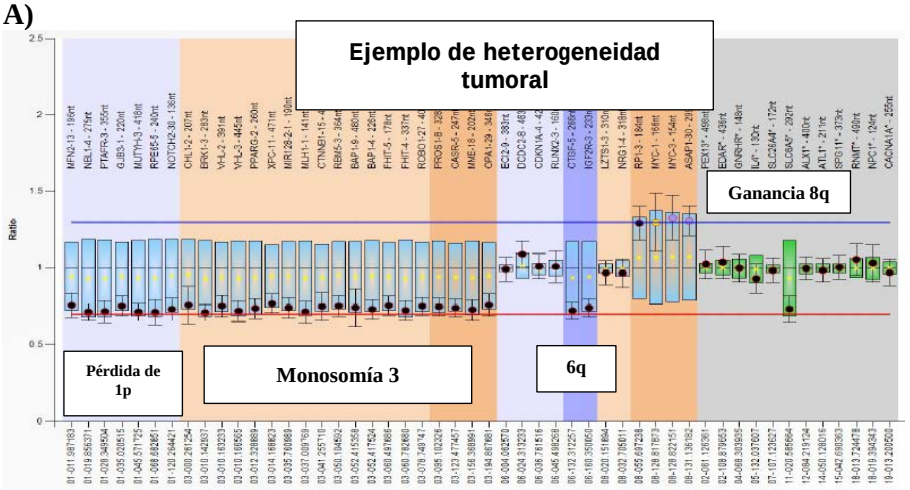
VII. ANEXOS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

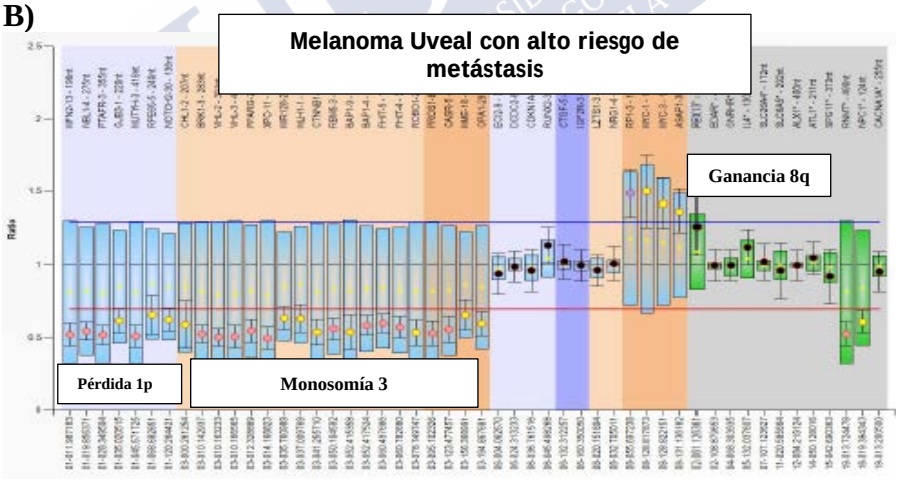
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO I: Ejemplo de los resultados obtenidos para el análisis de una muestra de MU empleando el kit SALSA® MLPA® probemix P027-C1. **A)** Heterogeneidad tumoral; presencia de mosaicismo celular entre un patrón normal y otro con células tumorales con pérdida de 1p, M3, pérdida de 6q y ganancia de 8q. **B)** MU con alto riesgo de metástasis, mostrando pérdida de 1p, M3 y ganancia de 8q.

A)

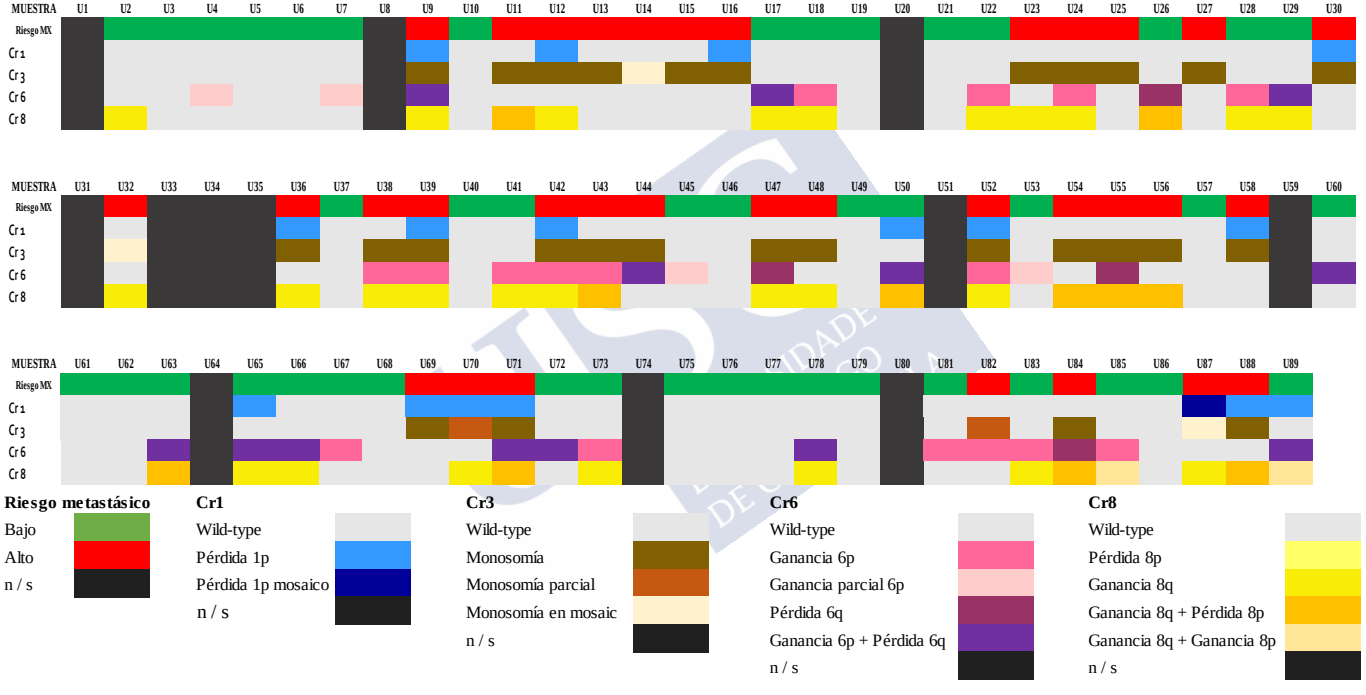


B)



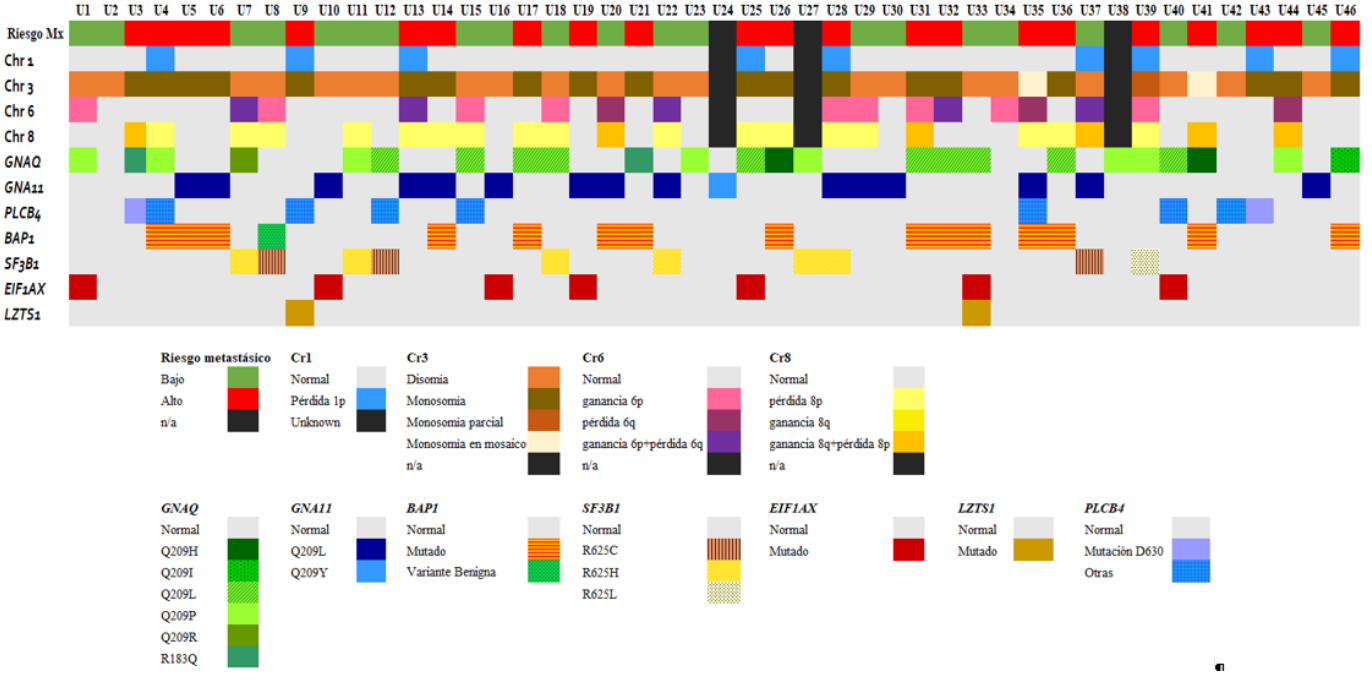
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO II: Esquema cromático representativo de la distribución de las alteraciones cromosómicas detectadas en cada uno de los 89 MU estudiados mediante MLPA en el Capítulo 2.



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO III: Esquema cromático descriptivo unificado del patrón de distribución de alteraciones cromosómicas y mutaciones somáticas detectadas en las 46 muestras de MU estudiadas en el Capítulo 3.



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO IV: Dictamen Comité de Ética de Investigación Clínica Galicia (Código de Registro CEIC de Galicia: 2009/128).

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral

Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia
Edificio Administrativo de San Lázaro
15781 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tlf: 881 546425 Fax: 881 541804
ceic@sergas.es

DITAME DO COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALIZA

D. Xoán X. Casas Rodríguez , Secretario do Comité Ético de Investigación Clínica de Galiza

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 10/06/2009 o estudo:

Título: Detección y evaluación de biomarcadores pronósticos en el melanoma uveal
Promotor: Antonio Piñeiro Cés
Código do Promotor:
Código de Rexistro CEIC de Galicia: 2009/128

Que se cumpren os requisitos éticos aplicábeis a este tipo de estudos, están xustificados os riscos e molestias previsíbeis para o suxeito e é adecuado o procedemento para obter o consentimento informado.

E que este Comité acepta, de conformidade cos seus Procedementos Normalizados de Traballo, que o devandito estudo sexa realizado nos seguintes centros:

Centros	Investigadores principais
C.H. Universitario de Santiago	Antonio Piñeiro Cés

Santiago de Compostela, 16 de xuño de 2009
O Secretario,

SERVIZO GALEGO DE SAÚDE · COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALICIA · CONSELLERÍA DE SANIDADE

Xoán X. Casas Rodríguez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO V: Dictamen Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia, resolución enmienda febrero de 2019 sobre el proyecto "Detección y evaluación de biomarcadores pronósticos en el melanoma uveal (Código de Registro 2009/128).

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881546425
ceic@sergas.es

galicia

DICTAMEN DEL Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 28/02/19, la modificación del estudio:

Título: Detección y evaluación de biomarcadores pronósticos en el melanoma uveal
Versión modificación: *modificación Febrero 2019*
Promotor: *Antonio Piñeiro Cés*
Código del Promotor:
Código de Registro: 2009/128

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles, que dicha enmienda sea incorporada al estudio de investigación.

Documento asinado dixitalmente por:
Paula López Vázquez (05/03/2019 10:19)
https://sede.xunta.gal//cveNdcre=SAOC-F4G4-BOAH-QF4O-TEGE-F155-1777-5480-96

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881546425
ceic@sergas.es

galicia

Y HACE CONSTAR QUE:

1 El comité cumple los requisitos legales vigentes aplicables a los Comités de ética de investigación.
2 El comité tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3 La composición actual del comité es:

Susana María Romero Yuste (Presidenta). Médico Especialista en Reumatología.
Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.
Paula Mª López Vázquez, (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.
Belen Pérez Marcos (Vicesecretaria). Farmacéutica de Atención Especializada
Jesús Alberdi Sudupe. Médico especialista en Psiquiatría.
Rosendo Bugarín González. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.
Nuria Carballeda Feijóo. Miembro lego. Representante de los intereses de los pacientes.
Juana Mª Cruz del Río. Trabajadora Social.
Ana Belen Cruz Valiño. Licenciada en Derecho.
Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.
José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.
José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.
Mª José Ferreira Díaz. Diplomada Universitaria de Enfermería.
Agustín Pía Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria
Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.
Diego Santos García. Médico Especialista en Neurología.
Juan Vázquez Lago. Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
Mª Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica.

En Santiago de Compostela,

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE

Documento asinado dixitalmente por: Paula López Vázquez (05/03/2019 10:19)
https://sede.xunta.gal//cve?dCve=5A0C-F4G4-BOAH-QF4O-TEQE-F155-1777-5480-96

ANEXO VI: Modelo de hoja de información al paciente.

Unidad de Tumores Intraoculares del Adulto
Servicio de Oftalmología
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago

DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS EN EL MELANOMA UVEAL
CONSENTIMIENTO INFORMADO POBLACIÓN CASOS

Mediante este documento nos dirigimos a usted para informarle sobre el Proyecto de Investigación titulado **DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS EN EL MELANOMA UVEAL**, para el cual solicitamos su colaboración. Este Proyecto se lleva a cabo en la Unidad de Tumores Intraoculares del Adulto en el Servicio de Oftalmología, del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

La finalidad de este documento es que reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no donar una **muestra biológica** para esta investigación. Para ello, por favor lea esta hoja informativa con atención, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Puede consultar con las personas que considere oportuno, además de con el Investigador Principal y miembros del equipo investigador.

1.-ANTECEDENTES

El melanoma uveal es el tumor intraocular primario más frecuente en la edad adulta del ser humano. De manera global se estima que su incidencia es de aproximadamente seis casos por millón de habitantes y año. Aunque se trata de un cáncer menos agresivo que otros más frecuentes, puede provocar la muerte del paciente por desarrollo de enfermedad metastática (extensión a órganos vitales). En la última década se han refinado los tratamientos conservadores de este tumor con el fin de preservar el globo ocular y la vida del paciente. Sin embargo, todavía hoy en día nos resultan desconocidos los factores que hacen que, a pesar de recibir el mismo tratamiento, unos casos evolucionen favorablemente y otros no. El objetivo de este proyecto de investigación es, aprovechando las nuevas tecnologías en **Biología Molecular**, intentar identificar marcadores que nos permitan conocer mejor el pronóstico de cada paciente y así ajustar su tratamiento. Incluyendo la posibilidad, si fuese necesario, de llevar a cabo un test genético mediante secuenciación de nueva generación (Next-Generation Sequencing) en ADN (germinal o tumoral, siempre que fuera posible) para tratar de identificar alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo y pronóstico de esta patología.

2.-MUESTRAS BIOLOGICAS

Para el presente Proyecto de Investigación se consideran muestras biológicas con valor:
-sangre periférica (30 mL)
-fragmento del tumor (que nunca será mayor al 20% en volumen total)
-vítreo (tejido transparente que se encuentra dentro del ojo en una cantidad no superior a 1mL)
Los dos últimos tipos de muestra biológica sólo serán tomados en el caso de que por el diagnóstico o evolución de su enfermedad ocular fuese necesario enuclear su globo ocular.

3.-CONSENTIMIENTO

Le pedimos permiso para recoger una o varias de sus muestras biológicas con valor para este proyecto. Si usted acuerda donar estas muestras, es necesario que firme este formulario de consentimiento.

Una vez firmado, coincidiendo con una de sus visitas a la Unidad de Tumores Intraoculares del Adulto, le tomaremos una muestra de sangre.
Si se diese el caso de que por el diagnóstico o evolución de su enfermedad ocular fuese necesario enuclear su globo ocular, le solicitaríamos además un fragmento del tumor (que nunca será mayor al 20% en volumen de la masa total) y una muestra del vítreo del ojo enucleado (cantidad no superior a 1mL).

Las muestras biológicas cedidas por usted serán almacenadas en el Laboratorio de Investigación nº3 del Hospital Clínico de Santiago de Compostela (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago) en condiciones de congelación a -80ºC. El responsable de estas muestras será el Investigador Principal del Proyecto, el Dr. Antonio Piñeiro Ces, que pertenece a la unidad de Oncología Ocular del mismo Complejo Hospitalario. Esta persona será la encargada de codificar las muestras de manera reversiblemente disociada, es decir, de forma paralela a la toma de muestras se procederá a la recogida de datos de su historia clínica, que se asociarán a sus muestras biológicas. Estos datos serán los estrictamente necesarios para

UNIDAD DE TUMORES INTRAOCULARES DEL ADULTO
SERVICIO DE OFTALMOLOGIA
COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO
RAMON BALTAR S/N. 15706 SANTIAGO DE COMPOSTELA
TELEFONO: 981951757
Email: melanoma.eye@gmail.com

el desarrollo de esta investigación y serán almacenados en una base informatizada de acceso restringido (en cumplimiento de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

Excepcionalmente, y siempre que así lo autorice, se podría volver a contactar con usted para solicitar información adicional. Una vez transcurridos cinco años desde el inicio de la investigación todos los datos serán irreversiblemente disociados de las muestras, es decir, se desechará la información almacenada hasta el momento (en cumplimiento de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

4.- CESIÓN Y USO DE SU MUESTRA BIOLÓGICA Y/O DERIVADOS

La creación de esta colección de muestras biológicas se utilizará en el presente proyecto de investigación. Igualmente, su muestra podrá ser utilizada para cualquier proyecto de investigación futuro relacionado con la patología en estudio. Cualquier nuevo proyecto de investigación que requiera su muestra deberá ser previamente autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica y el Comité Científico de nuestra institución, que se encargan de supervisar la ética, la seguridad y la actividad científica de los estudios. La muestra será conservada durante todo el tiempo que dure su vida útil.

En el caso de que se produjera un desarrollo comercial de los conocimientos generados, los posibles beneficios que se pudieran recibir serán íntegramente destinados a satisfacer los objetivos científicos del grupo de investigación y a su mantenimiento. Firmando este formulario de consentimiento, usted renuncia a sus derechos sobre cualquier uso comercial relacionado con la información o las muestras que nos ha donado.

Su colaboración en este proyecto es voluntaria y la alternativa es no participar. Si usted elige no participar, esta decisión no afectará su asistencia médica.

Asimismo, usted puede retirar en cualquier momento su muestra del laboratorio donde permanecerá almacenada. En este caso, ningún nuevo dato será añadido a la base de datos, y se procederá a la destrucción de todas las muestras identificables, previamente retenidas, para evitar la realización de nuevos análisis.

Para retirar su muestra deberá contactar con el Investigador Principal, al que podrá localizar en el teléfono 981951756 y Email: melanoma.eye@gmail.com.

5.- INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

Los estudios moleculares que se puedan realizar en cualquiera de los proyectos de investigación que hagan uso de su muestra no se hacen para diagnosticar una determinada enfermedad en una persona concreta. Es decir, el objetivo es fundamentalmente de investigación básica y carecen de una utilidad clínica inmediata. De hecho, puede pasar bastante tiempo desde que se realice la extracción para su incorporación a la colección hasta que se obtenga algún dato de relevancia. Los tiempos de la investigación sobre su material biológico o derivado van a depender de las preguntas científicas que vayan surgiendo y no se corresponden con los tiempos de la atención clínica, generalmente más cortos.

Usted no será informado de los proyectos de investigación en los que se utilicen sus muestras, ni los investigadores informarán de los resultados de las pruebas moleculares a usted o a su médico de atención primaria, a menos que usted lo solicite o que los resultados de las pruebas con su muestra de sangre o derivados pudieran ayudarle a usted o a su médico a cambiar la actitud terapéutica en relación a su salud o la salud de su familia.

Si por alguna razón usted quisiera conocer los resultados de las investigaciones que se hayan llevado a cabo mediante el uso de su muestra en los sucesivos proyectos de investigación, podrá ponerse en contacto con el responsable del proyecto, que le informará debidamente.

6.- COSTE, RIESGOS, Y PROTECCIÓN FRENTE A DAÑOS

La extracción de la muestra no supondrá ningún coste económico para usted. El riesgo para su salud de una extracción de sangre es muy pequeño, pero puede incluir las molestias habituales de en este procedimiento médico común: dolor de menor importancia, sangrado por donde entra la aguja, o la ansiedad frente a las agujas. Se tomarán las precauciones adecuadas para evitar estos inconvenientes. El riesgo de tomar una muestra del tumor o vítreo una vez enucleado el globo ocular son inexistentes para su salud. Por otra parte, que la muestra de tumor sea menor a un 20% en volumen del total de la masa tumoral no afectará al análisis histopatológico.

7.- BENEFICIOS

UNIDAD DE TUMORES INTRAOCULARES DEL ADULTO
SERVICIO DE OFTALMOLOGIA
COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO
RAMON BALTAR S/N. 15706 SANTIAGO DE COMPOSTELA
TELEFONO: 981951757
Email: melanoma.eye@gmail.com

Aunque su colaboración en este proyecto de investigación no le garantiza ninguna ventaja directa, usted contribuirá a una mayor comprensión de la manera en que diferentes moléculas pueden influir en el pronóstico de la enfermedad melanoma uveal.
Además, los resultados de la futura investigación con su muestra biológica pueden ayudar a pacientes con la misma enfermedad, a sus familiares, y a la población en general.

8.- PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Su privacidad está protegida por las leyes nacionales (LO15/1999 y LGCS/2002) y de la Comunidad Europea (95/46/CE). Dado que durante la realización de los proyectos de investigación se generarán hallazgos moleculares sensibles, estas leyes quieren ayudar a los investigadores a evitar accesos involuntarios a esta información que podrían exponer a los pacientes, y a sus familias, a efectos adversos económicos, legales, psicológicos, y/o sociales.

De acuerdo a la LO15/1999, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de los datos. Asimismo, puede solicitar la destrucción de las muestras.

Para proteger su privacidad, su muestra biológica tendrá solamente un código alfanumérico para que no puedan identificarla por su nombre. Su muestra de sangre será identificada por un número de código que será diferente del número de código usado en la actividad clínica asistencial. Solamente el Investigador Principal podrá conectarlos el uno al otro. En ningún momento su nombre, dirección, o cualquier otra información que le identifique será desvelada para los propósitos de la investigación.

El acceso a su información personal quedará restringido al Investigador Principal del Proyecto, las autoridades sanitarias y al Comité Ético de Investigación Clínica, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos de los estudios, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

9.- DECLARACIÓN DEL PACIENTE

He sido informado de los riesgos o inconvenientes y de las posibles ventajas de mi colaboración en el Proyecto de Investigación **DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS EN EL MELANOMA UVEAL**.

Comprendo:

Que no tengo obligación de colaborar, y que mi negativa a hacerlo no implicará ninguna pena o pérdida de los derechos que me corresponden.

Que puedo retirar mis muestras de la base de muestras en cualquier momento.

Que los resultados de las investigaciones que utilicen mi material biológico o derivado podrán ser publicados, pero mis datos personales no serán revelados a menos que sean requeridos por ley.

Deseo ser informado de los resultados de los estudios moleculares realizados (rodear con un círculo su elección):

SI
NO

Accedo a que el Investigador Principal del proyecto contacte conmigo en un futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos inicialmente (rodear con un círculo su elección):

SI
NO

SU FIRMA INDICA QUE USTED HA LEÍDO Y ENTIENDE LA INFORMACIÓN ANTEDICHA, QUE USTED HA DISCUTIDO ESTE ESTUDIO CON LA PERSONA QUE OBTIENE ESTE CONSENTIMIENTO, QUE USTED HA DECIDIDO PARTICIPAR BASADO EN LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA, Y QUE SE LE HA DADO A USTED UNA COPIA DE ESTE FORMULARIO.

	o	
Firma del PACIENTE		Firma del FAMILIAR O TUTOR

UNIDAD DE TUMORES INTRAOCULARES DEL ADULTO
SERVICIO DE OFTALMOLOGIA
COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO
RAMON BALTAR S/N. 15706 SANTIAGO DE COMPOSTELA
TELEFONO: 981951757
Email: melanoma.eye@gmail.com

Fecha: ____ / _____ / _____
POR FAVOR, GUARDE UNA COPIA ÍNTEGRA DE ESTE FORMULARIO

Persona que obtiene consentimiento

Nombre:_____

Atestiguo que los requisitos para el consentimiento informado para la colección descrita en este formulario han sido satisfechos, que he proporcionado al participante una copia de este formulario, que he discutido los aspectos esenciales de la colección con el participante y le he explicado a él o a ella en términos no técnicos toda la información contenida en este formulario de consentimiento informado, incluyendo cualquier riesgo y reacción adversa que razonablemente se pueda esperar que ocurra. Igualmente, certifico que animé al participante a que hiciera preguntas y que todas las preguntas hechas fueron contestadas.

Firma de la persona que obtiene el consentimiento

Fecha: ____ / _____ / _____

ANEXO VII: Información referente al artículo original indexado en PUBMED reproducido en el apartado Resultados del capítulo 3 de la presente tesis doctoral. Artículo publicado en la revista Acta Ophthalmologica en enero de 2021, en versión online, pendiente de versión impresa.

Título: Role of somatic mutations and chromosomal aberrations in the prognosis of uveal melanoma in a Spanish patient cohort. Acta Ophthalmol (2021). PMID: 33421325.

Editorial: Wiley and Sons
Identificador online: https://doi.org/10.1111/aos.14760
Fecha de primera publicación (Online): 09 January 2021

Autores: Paula Silva-Rodríguez[1,2], Manuel Bande[2,3], Daniel Ferrnández-Díaz[3], Nerea Lago-Baameiro[4], María Pardo[2,4], María José Blanco-Teijeiro[2,3], Fernando Domínguez[1], Lourdes Loidi[1], Antonio Piñeiro[2,3]

Filiaciones:
[1]Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
[2]Tumores Intraoculares en el Adulto, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, España.
[3]Department of Ophthalmology, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
[4]Grupo Obesidómica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, España.

Factor de impacto Web of Science (WoS) 2020: 3,362
Cuartil categoría "Ophthalmology": **Q1**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO VIII: Autorización de la editorial para la reproducción de los resultados publicados en el artículo original publicado en la revista Acta Ophthalmologica:

Silva-Rodríguez, P., Bande, M., Fernández-Díaz, D., Lago-Baameiro, N., Pardo, M., José Blanco-Teijeiro, M., Domínguez, F., Loidi, L. and Piñeiro, A. (2021), Role of somatic mutations and chromosomal aberrations in the prognosis of uveal melanoma in a Spanish patient cohort. Acta Ophthalmol. https://doi.org/10.1111/aos.14760

Stefan Einarsson <stefan@actaophthalmologica.com> mar, 27 abr 8:59

para mí, AOS@wiley.com

inglés > español Traducir mensaje Desactivar para: inglés

Dear Paula Silva-Rodríguez,

Permission granted for annexing your manuscript to your thesis.
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aos.14760

Please clearly cite Acta Ophthalmologica.
https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1111%2Faos.14760

Best regards,
Stefan Einarsson
Editorial Manager

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 23, 2021

This Agreement between University of Santiago de Compostela -- Paula Silva Rodríguez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5054820039049
License date	Apr 23, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Acta Ophthalmologica
Licensed Content Title	Role of somatic mutations and chromosomal aberrations in the prognosis of uveal melanoma in a Spanish patient cohort
Licensed Content Author	Paula Silva-Rodríguez, Manuel Bande, Daniel Fernández-Díaz, et al
Licensed Content Date	Jan 9, 2021
Licensed Content Volume	0
Licensed Content Issue	0
Licensed Content Pages	13

Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title	Genetic basis of uveal melanoma: predisposition and prognosis associated with genetic variation
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	May 2021
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Rúa Xelmírez nº21 Santiago de Compostela, A Coruña 15704 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that

you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS

OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes

all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA