

'Game of Clones'

Aplicación de la secuenciación masiva en el estudio de la evolución genómica del melanoma

ANA AGUILAR RAMBLA
A1339237@uji.es

BÀRBARA HERNANDO
hernandb@uji.es

CONRADO MARTÍNEZ-CADENAS
ccadenas@med.uji.es

Resumen

Introducción: Tener un mayor conocimiento del inicio de la carcinogénesis a nivel molecular es esencial para definir nuevos biomarcadores que mejoren el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del paciente. **Objetivos:** Definir un protocolo bioinformático para evaluar el proceso mutacional asociado a la evolución carcinogénica del melanoma. **Método:** Se secuenciaron 46 genes clave en la carcinogénesis en 45 muestras cutáneas procedentes de 15 bloques tumorales de distintos pacientes. De cada bloque, se biopsiaron muestras de piel sana, nevus y melanoma. Tras procesar los datos de secuenciación filtrando las variantes germinales y los artefactos técnicos, se analizó el perfil mutacional y los signos de selección positiva en cada estadio. Los análisis bioinformáticos se realizaron con el software R. **Resultados:** El 73% de las lesiones precursoras se inician por la adquisición de una mutación oncogénica en *BRAF* (V600E). Esta alteración parece estar positivamente seleccionada en estadios tempranos de la carcinogénesis. Sin embargo, la inactivación del gen supresor tumoral *CDKN2A* parece ocurrir exclusivamente en melanomas, siendo una alteración genética seleccionada en la progresión maligna de las lesiones preneoplásicas. La firma mutacional procedente de la RUV (SBS7) es el principal causante de la acumulación de mutaciones somáticas en ambos estadios neoplásicos. **Conclusiones:** En el nevus y melanoma se observa la firma mutacional relacionada con la radiación ultravioleta demostrando así su efecto mutagénico ya en el estadio preneoplásico. Para la aparición de un melanoma, es necesaria la selección de clones portadores de mutaciones que favorezcan la proliferación celular y que permitan escapar al control del ciclo celular.

Palabras clave: carcinogénesis, secuenciación de nueva generación, mutaciones somáticas, firma mutacional, melanoma

Abstract

Introduction: A greater knowledge of the onset of the molecular genetics in carcinogenesis is essential to define new biomarkers that improve the diagnosis, treatment and prognosis of the patient. **Objectives:** To define a bioinformatic protocol to evaluate the mutational process involved in the carcinogenic evolution of melanoma. **Method:** We sequenced 46 cancer-relevant genes in 45 skin samples from 15 tumor blocks from different patients. Samples of healthy skin, nevus and melanoma were biopsied from each block. After processing the sequencing data by filtering the germinal variants and technical artifacts, the mutation profile and signs of positive selection at each stage were analyzed. The bioinformatic analysis was performed using the software R. **Results:** 73% of precursor lesions are initiated by the acquisition of an oncogenic mutation in *BRAF* (V600E). This mutation appears to be positively selected in early stages of carcinogenesis. However, inactivation of the tumor-suppressor gene *CDKN2A* appears to emerge exclusively in melanomas as a result of cancer gene selection in the malignant progression of preneoplastic lesions. The mutational signature from ultraviolet radiation (SBS7) is the main cause of the accumulation of somatic mutations in both neoplastic stages. **Conclusions:** In nevus and melanoma, the mutational signature related to ultraviolet radiation is observed, thus demonstrating its mutagenic effect already in the preneoplastic stage. For the progression of a melanoma is necessary the selection of clones that carry mutations that favor cell proliferation and allow escaping the control of the cell cycle.

Key Words: Carcinogenesis, Next-Generation Sequencing, Somatic Mutation, Mutational Signature, Melanoma

Introducción

Los cánceres son el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas, llamadas mutaciones, en las células a lo largo de la vida. La acumulación de estas mutaciones sobre ciertos genes importantes en el control del ciclo celular permite su proliferación descontrolada y una mayor acumulación que va a condicionar la transformación maligna de las células, que a su vez cada vez serán más diferentes de las células del tejido de origen (Stratton, Campbell y Futreal 2009).

En concreto, el melanoma es el cáncer de piel menos frecuente, pero también es el que tiene mayor gravedad por su rápido crecimiento y su mayor probabilidad de generar metástasis («National Cancer Institute», n.d.). Su principal factor de riesgo es la radiación ultravioleta (RUV) (Hernando et al. 2020). Concretamente, aquella que es de elevada intensidad y periódica. Sobre todo, cuando se produce durante la infancia y la adolescencia (Goldsmith et al. 2014, 1416-1444).

El mecanismo por el cual la RUV produce cáncer de piel es el intercambio de citosinas por timinas (transiciones de tipo C>T), sobre todo cuando la citosina mutada está precedida por otra pirimidina (Martincorena et al. 2015). Estas mutaciones se corresponden con la firma mutacional número 7 (SBS7) («COSMIC», n.d.), que es la que se ha relacionado con la RUV (Hernández, Sánchez, Morillo y Sánchez 2018, 5-11), entendiendo como firma mutacional aquella combinación de alteraciones genéticas que son características de un agente mutágeno (Tang et al. 2020). El conocimiento de las diferentes firmas mutacionales y la tecnología de la bioinformática permite que, sin poder ver el proceso de mutagénesis ni cómo han actuado los agentes mutágenos sobre el tejido, a partir del estudio de las diferentes combinaciones de alteraciones genéticas características de los agentes mutágenos, se pueda deducir cuáles de ellos han actuado para formar la lesión que se está estudiando (Carracedo Pérez y Valle Velasco 2020, 1193-1210).

Justificación

El desarrollo de la bioinformática y el abaratamiento de la técnica de secuenciación de nueva generación han supuesto una revolución en la medicina. Su aplicación permite la detección de biomarcadores que conllevan a la realización de un diagnóstico más preciso y a la detección de dianas moleculares que permitirán el desarrollo de una terapia dirigida a las características de cada lesión.

Estas técnicas de secuenciación se han empleado para analizar el perfil de alteraciones genómicas presentes en melanomas de estadio avanzado. Sin embargo, estos estudios no son capaces de evaluar el orden en el que se han producido las alteraciones genéticas que dan lugar a un melanoma y, por tanto, no nos permiten conocer el proceso carcinogénico. Como algunos melanomas surgen a partir de lesiones preneoplásicas, se puede estudiar el proceso de evolución tumoral en sus diferentes estadios histológicos.

Nuestro estudio surge de la necesidad de entender la evolución genómica del melanoma a partir de una lesión precursora, específicamente del nevus melanocítico, y así precisar el orden de las alteraciones genéticas que conducen a la evolución tumoral. Asimismo, también pretende analizar las firmas mutacionales presentes en ambos tipos de lesiones, para poder conocer los principales agentes mutagénicos que han actuado en la generación del nevus y del melanoma. Mediante ambos estudios, se podría detectar mutaciones que sirvan como biomarcadores para la detección temprana del melanoma y para mejorar el diagnóstico y pronóstico de los pacientes.

Métodos

Población de estudio y recogida de datos

El estudio se realizó con 15 bloques tumorales procedentes de 15 pacientes en los que se había desarrollado un melanoma a partir de un nevus melanocítico preexistente. Dichos bloques fueron introducidos en formol para su fijación, y posteriormente

en parafina para su preservación y para facilitar la realización de cortes histológicos. Cada uno de estos bloques, fue estudiado de forma individual por el servicio de anatomía patológica del Hospital General Universitario de Valencia. Para su estudio, se tiñó el primer corte histológico con hematoxilina-eosina, para así diferenciar las tres áreas que componen la muestra (piel sana, nevus melanocítico y melanoma). De cada una de estas tres áreas se extrajo una biopsia mediante un punch de 2 mm de diámetro, obteniendo así un total de 45 muestras.

Todos los participantes dieron su consentimiento por escrito para ser incluidas en la investigación. El proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Análisis de mutaciones somáticas mediante secuenciación masiva

Para identificar las mutaciones en las biopsias realizadas, se realizó la secuenciación dirigida de 46 genes en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona mediante secuenciación masiva o NGS. Las secuencias obtenidas en formato fastq fueron alineadas con el genoma humano de referencia (Hg19) para obtener un archivo *bam* donde se incluye datos de alineamiento de las secuencias (se ordenan los nucleótidos secuenciados según sus coordenadas genómicas).

Los 46 genes que se secuenciaron son genes que ya han sido previamente relacionados con el cáncer de piel o en el proceso de progresión tumoral (Hernando et al. 2020) y son: *ADAM29*, *ADAMTS18*, *ARID1A*, *ARID2*, *BAI3/ADGRB3*, *BRAF*, *CDKN2A*, *CRNKL1*, *EPHA2*, *EZH2*, *FAT1*, *FAT2*, *FGFR3*, *GRIN2A*, *GRM3*, *HRAS*, *IL7R*, *KRAS*, *MECOM*, *MLL2/KMT2B*, *NEBL*, *NF1*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PLCB1*, *PPP6C*, *PPP1R3A*, *PREX2*, *PTCH1*, *PTEN*, *PTPRB*, *PTPRK*, *RAC1*, *RB1*, *RBM10*, *SALL1*, *SCN1A*, *SF3B1*, *SPHKAP*, *STAT5B*, *TP53*, *TERT* y *ZNF750*.

Procesamiento de los datos obtenidos mediante secuenciación

a) Cálculo de la pureza de las muestras

Tanto los nevus como los melanomas crecen en un microambiente de células estromales (fibroblastos, queratinocitos), que, al no ser parte de la lesión, no provienen de la célula inicial a partir de la que se ha desarrollado dicha lesión y, por tanto, no tienen las mutaciones somáticas presentes en el tumor (Shain et al. 2015). Por este motivo, es importante calcular la pureza de la muestra (porcentaje de células tumorales) para poder ajustar los parámetros estimados a la fracción tumoral.

El cálculo de la pureza de las muestras se ha realizado teniendo en cuenta la frecuencia alélica de la mutación conductora que favorece en el momento inicial la proliferación tumoral. Esto es posible porque todas las células de una neoplasia provienen de esa primera célula que consiguió acumular un conjunto de mutaciones ventajosas que le permitieron proliferar de forma autónoma (Stratton, Campbell y Futreal 2009). Siguiendo esta lógica, si todas las células de una muestra fueran

tumorales, deberían de tener la mutación oncogénica. Como dicha mutación es dominante, solo es necesario que se produzca en una copia del gen. En consecuencia, la frecuencia de esta mutación del tumor debería de ser como máximo de 0,5 (50% de las copias portarán la mutación). Por ello, estudiando la diferencia entre la frecuencia presente en nuestras muestras, que depende de la pureza de cada muestra, y de la frecuencia esperable en una muestra tumoral que es de 0,5, se puede deducir la fracción de células tumorales que hay en cada muestra. Para calcularlo, se emplea la siguiente ecuación: $N = 1 - 2F$ (Shain et al. 2015), donde N es la fracción del tejido de células normales o no tumorales y F es la frecuencia del alelo mutante. Por tanto, la fracción tumoral de la muestra es 2F. Una vez calculada la pureza de la muestra, se ha realizado la normalización de la frecuencia de cada variante genética o alelo mutante (VAF del inglés *Variant Allele Frequency*), observada en la totalidad del tejido biopsiado respecto a la parte tumoral de la muestra. La fórmula utilizada es: $Norm_{VAF} = (VAF \times 100) / (2F)$, donde VAF es la frecuencia del alelo alternativo y 2F es la fracción tumoral de la muestra, que ha sido previamente calculada.

b) Estudio del número de lecturas de las muestras

En la figura 1, se muestra un diagrama de barras con las muestras diferenciadas por tejido y ordenadas de mayor a menor cobertura o número de lecturas. La media del número de lecturas por muestra es de $407,78 \pm 237,94$. La muestra con mayor cobertura tiene 1110,82 lecturas y la muestra con menor cobertura tiene 7,81 lecturas.

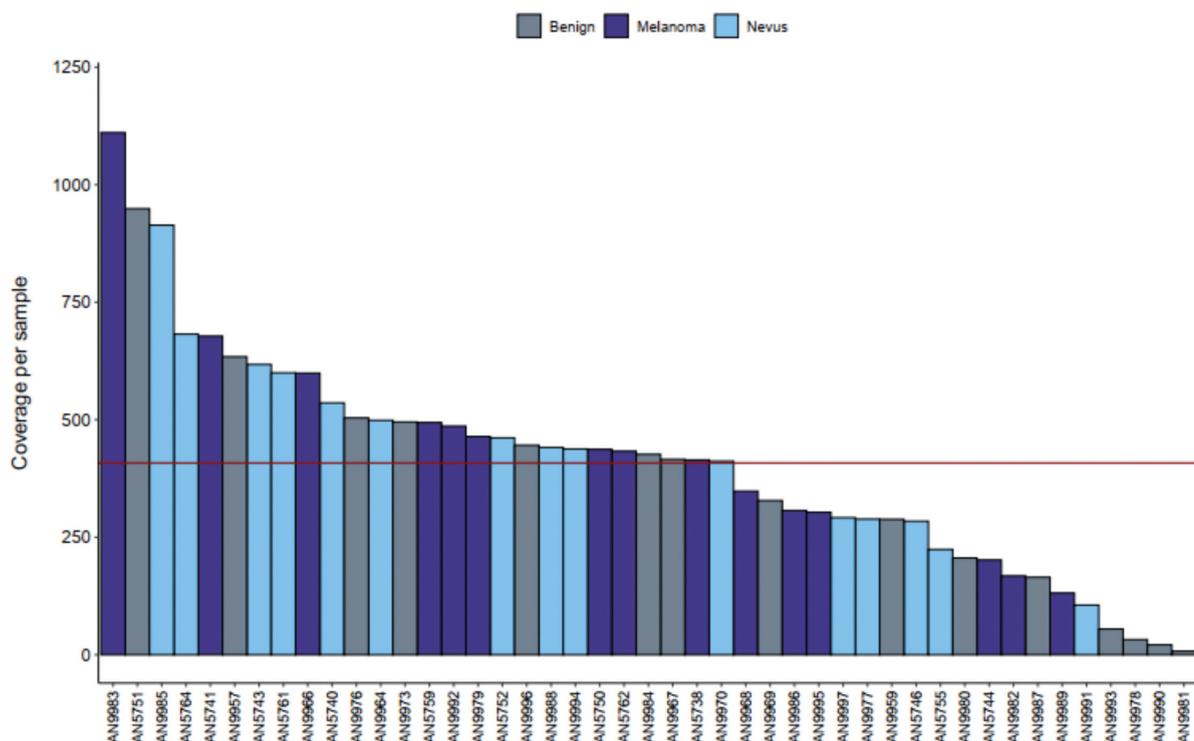


Figura 1. Cobertura por muestra

En la figura 2, se muestra un diagrama de puntos con los diferentes genes secuenciados ordenados de mayor a menor cobertura. La media del número de lecturas de las muestras por gen es de $407,78 \pm 81,38$, siendo CDKN2A el gen con menor cobertura media (179,29 lecturas) y RB1 el gen con mayor cobertura media (563,06 lecturas).

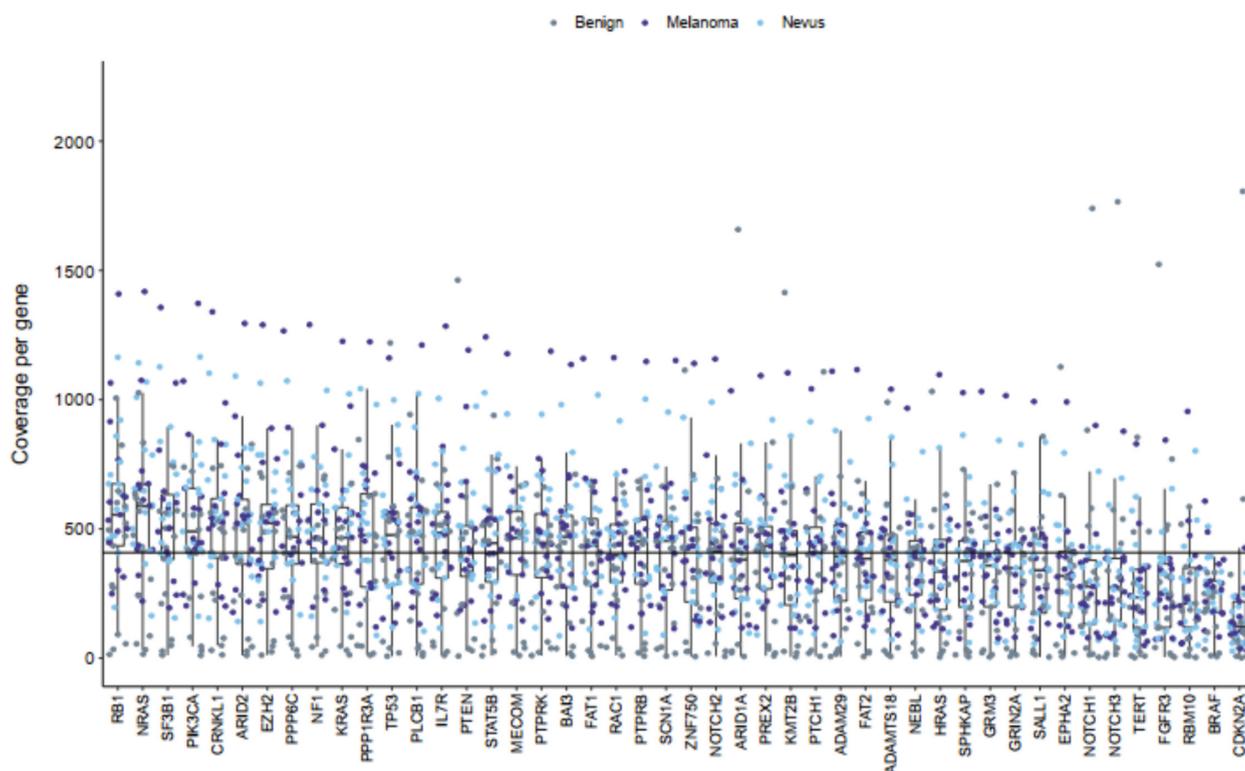


Figura 2. Cobertura por muestra

c) Estudio de las mutaciones oncogénicas

Las neoplasias se forman a partir de una célula que adquiere una mutación conductora que le permite escapar los controles que regulan el ciclo celular (Stratton, Campbell y Futreal 2009). El estudio de dichas mutaciones ha revelado que las muestras de nevus y melanomas obtenidas de 7 de los 15 pacientes incluidos en el estudio no tenían la misma mutación oncogénica. Esto podría indicar que el melanoma no ha surgido realmente del nevus, sino que ambas lesiones han surgido de forma independiente compartiendo la localización. En consecuencia, no cumplían los criterios de inclusión del estudio y, por tanto, se han descartado del análisis.

Para estudiar las mutaciones presentes en las muestras analizadas, se ha empleado la base de datos COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) donde se pueden consultar las mutaciones somáticas que se han relacionado con el

cáncer en humanos, así como el tipo de cáncer con el que se relaciona y en que tejidos se puede encontrar (COSMIC, n.d.).

En la Tabla 1 se muestran las mutaciones COSMIC presentes en las muestras que han sido incluidas en el estudio. Las mutaciones están clasificadas por paciente y tipo de tejido, estando destacadas en negrita las comunes a ambos tejidos.

Tabla 1

Mutaciones COSMIC presentes en las muestras

Paciente	Tejido	Código muestra	Mutación oncogénica	Paciente	Tejido	Código muestra	Mutación oncogénica
PAR011	N	AN5740	COSM476 (BRAF) , COSM1452506 (GRM3), COSM298682 (GRIN2A) , COSM454786 (PREX2)	PAR092	N	AN9988	COSM476 (BRAF) , COSM1252033 (FAT1), COSM133961 (NOTCH2), COSM229755 (PREX2), COSM233117 (PLCB1), COSM308879 (ADAM29)
	M	AN5738	COSM476 (BRAF), COSM298682 (GRIN2A)		M	AN9986	COSM476 (BRAF) , COSM1253806 (GRM3), COSM139406 (SCN1A)
PAR013	N	AN5743	COSM476 (BRAF) , COSM1367181 (RB1), COSM136757 (NOTCH1), COSM1701373 (PTCH1), COSM1713272 (CRNKL1), COSM226609 (PPP1R3A)	PAR093	N	AN9991	COSM584 (NRAS) , COSM1008710 (SCN1A), COSM109634 (GRIN2A), COSM1410661 (CRNKL1), COSM278971 (ARID2), COSM43737 (TP53)
	M	AN5741	COSM476 (BRAF), COSM226609 (PPP1R3A)	M	AN9989	COSM584 (NRAS) , COSM44200 (TP53)	
PAR028	N	AN9985	COSM584 (NRAS), COSM1673467 (PPP1R3A)	PAR105	N	AN9994	COSM476 (BRAF) , COSM1729882 (FAT1), COSM340299 (PREX2), COSM43682 (TP53), COSM984954 (TP53)
	M	AN9983	COSM584 (NRAS), COSM1673467 (PPP1R3A), COSM175923 (GRIN2A)	M	AN9992	COSM476 (BRAF) , COSM109835 (MECOM), COSM1111500 (PTCH1), COSM13594 (PIK3CA), COSM1679494 (TP53), COSM44700 (TP53), COSM720365 (SPHKAP)	
PAR071	N	AN5752	COSM476 (BRAF)				
	M	AN5750	COSM476 (BRAF)				
PAR080	N	AN9970	COSM476 (BRAF) , COSM142142 (ADAM29)				
	M	AN9968	COSM476 (BRAF) , COSM1151204 (PPP6C), COSM1476910 (PTPRB)				

d) Filtrado de variantes germinales y artefactos técnicos

Una vez obtenidos los datos de secuenciación, se llevaron a cabo los análisis bioinformáticos centrados en procesar los datos brutos y así determinar el perfil mutacional en cada una de las muestras.

Para eliminar las mutaciones de la línea germinal se ha utilizado el programa Mutect2 que está diseñado para detectar las variantes somáticas. Este programa incluye varias herramientas, como una que permite comparar las muestras con lesiones que se quieren estudiar con sus respectivos controles de tejido sano, siendo capaz de detectar las variantes de la línea germinal, y separándolas así de las somáticas que se quieren analizar. Este paso se debe de hacer al principio para evitar el gasto de recursos computacionales en mutaciones de la línea germinal que se van a acabar eliminando (Liu et al. 2019). Posteriormente, Mutect2 aplica diferentes filtros para eliminar artefactos técnicos. Sin embargo, debido a que se utilizan muestras de parafina, es necesario aplicar filtros adicionales para reducir el número de falsos positivos.

Estudio de la firma mutacional

Hemos empleado el paquete deconstructSign, disponible para el software R, para analizar el perfil mutacional de las muestras y así poder determinar qué firmas mutacionales están presentes en las diferentes muestras analizadas.

Estudio de la presencia de selección positiva

Hemos empleado el paquete dNdScv, disponible para el R Project, para cuantificar el exceso de mutaciones no sinónimas respecto a las mutaciones sinónimas presentes en las diferentes muestras analizadas y poder estudiar si existe selección positiva de ciertas mutaciones somáticas.

Resultados

Filtrado de variantes germinales y artefactos técnicos

Con la intención de que todas las mutaciones estudiadas sean debidas al proceso que se quiere analizar, se han aplicado los filtros mostrados en el diagrama de la figura 3 para tratar de eliminar aquellas mutaciones que hayan sido causadas por artefactos técnicos o bien pertenezcan a la línea germinal. Partiendo de una muestra inicial de 4.575 alteraciones genéticas, se ha llegado a una muestra final 531 alteraciones genéticas.

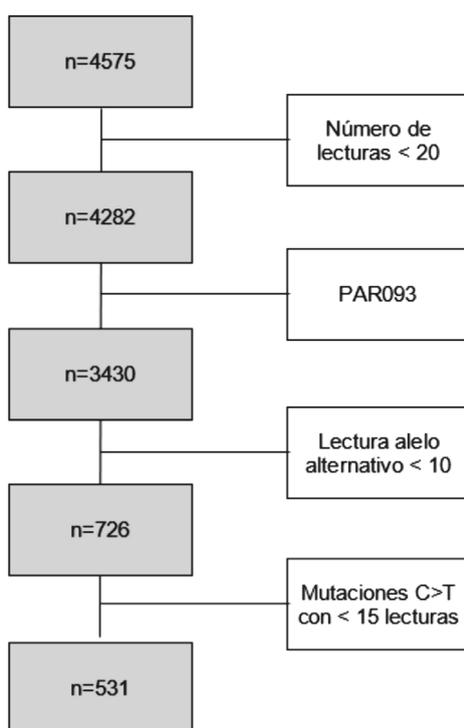


Figura 3. Diagrama de filtrado de mutaciones de la línea germinal y de artefactos técnicos

Los filtros aplicados son:

1. Eliminación de las alteraciones genéticas cuyo número de lecturas era inferior a 20 por su alta probabilidad de ser artefactos.
2. Eliminación de la muestra PAR093 por tener un número excepcionalmente bajo de lecturas en su muestra de tejido sano. Esto imposibilita el filtrado de las variantes germinales, por lo que se estudiarían mutaciones de la línea germinal como si fueran mutaciones somáticas producidas por el proceso mutacional que se estudia y, por tanto, disminuiría la calidad de los resultados.
3. Eliminación de las mutaciones con cobertura del alelo alternativo las muestras de nevus y melanoma sea inferior a 10. Se ha establecido un límite de 10 lecturas porque maximizaba la especificidad y sensibilidad del método de selección de las mutaciones somáticas. Como medida de control, se comprobó que ninguna de las mutaciones COSMIC se habían perdido tras aplicar este exigente filtro.
4. Filtrado de artefactos producidos por la parafina: la preservación de las muestras embebidas en introduce mutaciones de tipo C>T, especialmente en aquellas que están seguidas por una guanina (Xuan et al. 2013). Así pues, para dichas mutaciones se utilizó un filtro aún más exigente que con el resto de las mutaciones, estableciendo el límite en 15 lecturas. La necesidad de filtrar estas alteraciones debidas a la parafina se hace especialmente importante al analizar muestras cutáneas expuestas al sol, puesto que las mutaciones de tipo C>T son características del daño introducido por la RUV, uno de los principales factores de riesgo del melanoma. En consecuencia, no filtrar las mutaciones debidas a la parafina, se traduciría en una sobreestimación del efecto de la RUV en el proceso cancerígeno del melanoma y, por tanto, en una incorrecta interpretación de la firma mutacional presente en las lesiones analizadas.

Estudio de la firma mutacional

La firma mutacional es un patrón de alteraciones genéticas que se asocia a un mutágeno determinado. Esto permite que, al estudiar las mutaciones presentes en un tejido, al reconocer dichos patrones se pueda conocer los carcinógenos implicados en la generación de la lesión estudiada. Para el estudio de las firmas mutacionales presentes en los tejidos, se ha empleado el paquete deconstructSigs disponible para R, el cual analiza las firmas mutacionales presentes y su influencia sobre el tejido (Rosenthal et al. 2016). La interpretación de los perfiles mutacionales detectados se ha realizado utilizando la base de datos COSMIC, donde se recogen etiologías asociadas a cada firma mutacional de tipo SBS (*single-base substitution*) («*single-base sustitution*»), n.d.).

En la figura 4, se muestra el perfil mutacional de las alteraciones somáticas acumuladas en las muestras procedentes de nevus. Dicho perfil está formado por la combinación de 5 firmas mutacionales, siendo SBS25 y SBS7_B las que tienen mayor actividad.

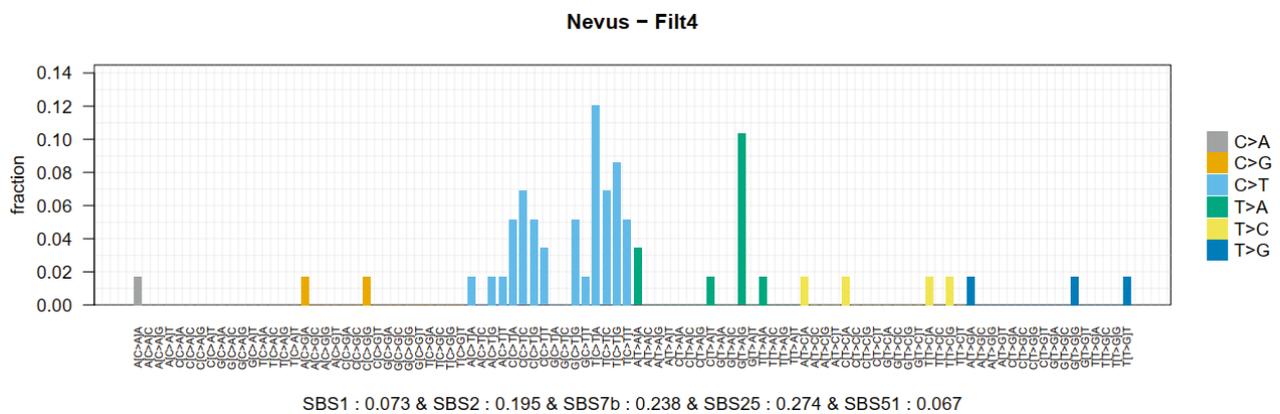


Figura 4. Firmas mutacionales presentes en el nevus

La firma mutacional SBS7_B se ha encontrado con un resultado de 0,238. Esto quiere decir que el 23,8% de las alteraciones genéticas encontradas en las muestras se debe al mutágeno asociado a esta firma mutacional, que en este caso se trata de la exposición a la RUV («COSMIC», n.d.).

Respecto a la firma mutacional SBS25, se puede afirmar que el 27,4% de las alteraciones genéticas de la muestra han sido causadas por dicha firma, correspondiendo en este caso a la actividad de la quimioterapia («COSMIC», n.d.).

En la figura 5, se muestra el perfil mutacional de las alteraciones somáticas acumuladas en las muestras procedentes de melanoma. El perfil mutacional está formado por la combinación de 6 firmas mutacionales, siendo las de mayor actividad las firmas mutacionales SBS7a y SBS31.

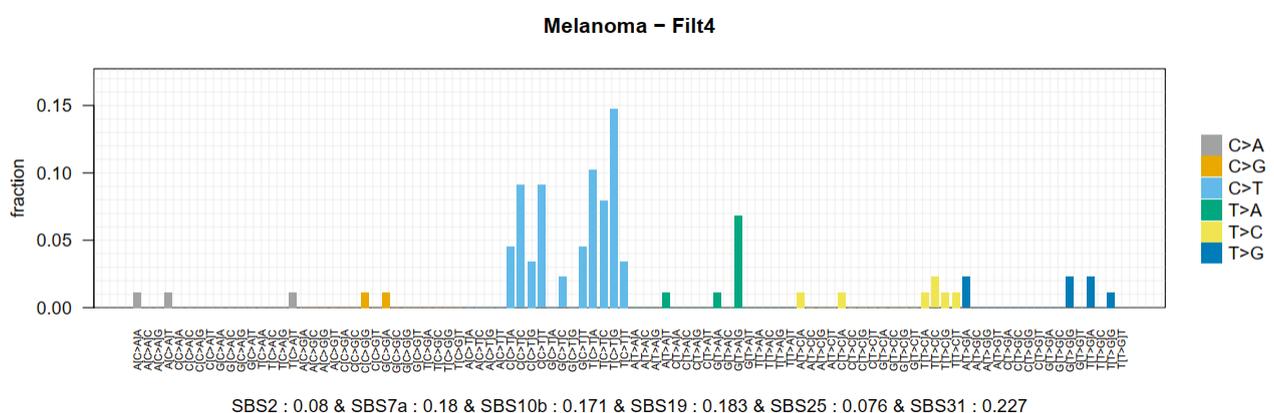


Figura 5. Estudio de la firma mutacional del melanoma con el programa deconstructSigs

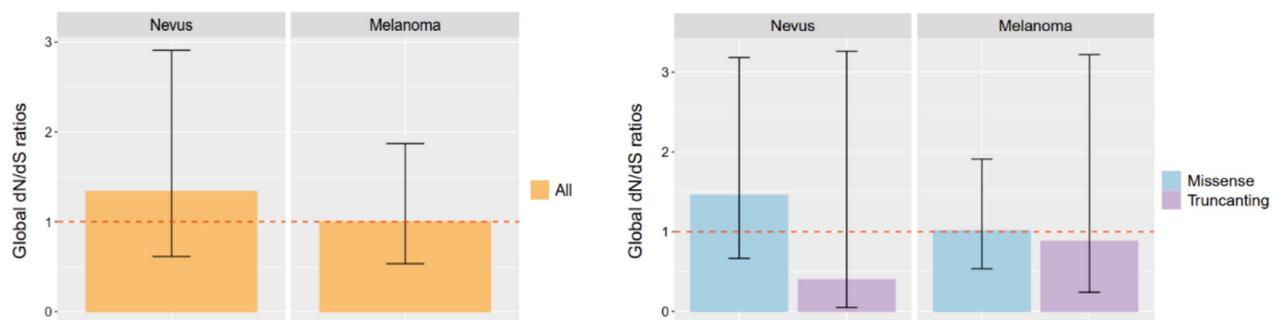
Un 18% de las alteraciones genéticas de las muestras se deben a la acción de la firma mutacional SBS7a. Esta firma es la que se relaciona con la exposición a la RUV, que es un factor de riesgo conocido del melanoma («COSMIC», n.d.).

Un 22,7% de las alteraciones genéticas de las muestras se deben a la acción de la firma mutacional SBS31, la cual se ha relacionado con quimioterapia por fármacos basados en el platino («COSMIC», n.d.).

Estudio de la selección de mutaciones

Finalmente, se quería analizar si existen algunas alteraciones concretas que son seleccionadas en el proceso carcinogénico. Para realizar los análisis de selección positiva, se ha empleado el software dNdScv, el cual permite conocer qué mutaciones se han seleccionado mediante el establecimiento de ratios. Para ello, se dividen las mutaciones no sinónimas entre las sinónimas, y si el resultado es mayor a 1 quiere decir que hay más mutaciones de las que sería esperable debido al azar y por tanto sí que hay selección (Martincorena et al. 2017). El análisis se realizó utilizando la lista completa de mutaciones encontradas por tipo de tejido y por gen.

Los resultados del análisis realizado por tejido se presentan de dos maneras distintas: 1) ratio de selección positiva para todas las mutaciones no sinónimas (figura 4) y 2) ratio de selección positiva para las mutaciones clasificadas como *missense*, *nonsense* y *splicing* (figura 5). Cabe destacar que, en este tipo de análisis, los resultados no han sido significativos, puesto que como se verá a continuación en las diferentes figuras, el intervalo de confianza atraviesa el 1 en ambos casos. Sin embargo, sí que parece existir una tendencia en las muestras procedentes de nevus a seleccionar las mutaciones *missense*. Esto tiene sentido, puesto que las mutaciones típicas en nevus son *missense* (BRAF V600E o NRAS).



Por otro lado, también se hizo el estudio por genes. En el nevus, se obtuvo que existe una selección positiva de mutaciones conductoras en el gen *BRAF*, siendo la ratio dN/dS de 78,91 con un q-valor de $7,14 \times 10^{-6}$. En el caso del melanoma, no solo se han seleccionado mutaciones activantes en el gen *BRAF* (dN/dS ratio = 42,26, q-valor de $1,4 \times 10^{-3}$) sino que también existe una selección positiva de mutaciones inactivantes o de pérdida de función del gen *CDKN2A* (dN/dS ratio = 78,91, q-valor = $1,3 \times 10^{-2}$).

Discusión y conclusiones

Este trabajo surge de la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la evolución genómica del melanoma a partir de una lesión precursora, específicamente del nevus melanocítico, así como de tratar de conocer aquellos mutágenos que actúan en el proceso de carcinogénesis. Además, este estudio también se centra en conocer los agentes mutágenos que han actuado como carcinógenos en el desarrollo del nevus y del melanoma. Esto es posible gracias al análisis de la firma mutacional.

La selección positiva de mutaciones drivers tiene un papel clave en la evolución tumoral (Stratton, Campbell y Futreal 2009). En este trabajo, el análisis de selección se ha realizado tanto agrupando todas las mutaciones no sinónimas como separando dichas mutaciones en diferentes categorías según su impacto a nivel de proteína (*missense*, *nonsense* y *splicing*). En todos los casos, los resultados no han sido significativos. Sin embargo, al realizar el estudio para cada uno de los genes de forma independiente, los resultados muestran que existe una selección positiva de mutaciones missense en el gen *BRAF* tanto en los nevus como en los melanomas analizados. Además, en el caso de las muestras de melanoma, también existe una selección positiva de mutaciones *truncating* en el gen *CDKN2A*. Estos resultados tienen sentido biológico, puesto que *BRAF* es un oncogén, y su mutación hace que el ciclo celular deje de estar regulado, permitiendo que la célula se divida con mayor frecuencia. En cambio, para que se desarrolle el melanoma no es suficiente con únicamente adquirir una mutación que le confiera la capacidad de activar la proliferación, sino que también requiere la falta de control del ciclo celular mediante la adquisición de mutaciones inactivantes en genes supresores tumorales como *CDKN2A* (Jorde, Carey y Bamshad 2021; Kierszenbaum 2020). La mutación del gen *CDKN2A* es importante en la evolución del melanoma, puesto que dicha mutación conlleva al mal funcionamiento de puntos clave en la regulación del ciclo celular como el punto de control G1 (Davis, Shalin y Tackett 2019).

Respecto al estudio de las firmas mutacionales, se ha obtenido que las firmas mutacionales con mayor actividad en las muestras analizadas son la SBS7, la SBS25 y SBS31. La firma mutacional SBS7 se ha asociado a la RUV («COSMIC», n.d.) lo que confirma su papel ya conocido como agente mutágeno en el cáncer de piel. Además, el hecho de encontrarse también en la lesión benigna, el nevus, también refuerza su papel como mutágeno en todas las etapas histológicas.

En referencia a las otras dos firmas mutacionales detectadas, tanto la SBS25 en nevus, como la SBS31 en melanoma están relacionadas con el tratamiento quimioterápico («COSMIC», n.d.). Como se explica en Pich et al. (2019), los tratamientos contra el cáncer inducen daño en el ADN de tanto las células cancerígenas como de las células sanas, puesto que muchas quimioterapias causan daño en el ADN produciendo mutaciones en ambos tipos celulares. La mayor parte de las células afectadas morirá, pero otras pueden sobrevivir y su descendencia tendrá mutaciones secundarias asociadas a este daño celular. Estas alteraciones genéticas, compartidas por todas las células descendientes de las células cuya información genética fue dañada por la quimioterapia, tendrán un patrón característico asociado a dicho fármaco, por lo que será reconocido como una firma mutacional específica. En el caso de nuestro estudio, no se ha recogido los datos de antecedente de cáncer, por lo que no se puede estudiar la relación existente entre estas firmas mutacionales y nuestra muestra.

Como limitaciones de este trabajo, cabe destacar que no ha sido posible el uso de programas específicos para calcular la pureza de las muestras, como por ejemplo *ascatNGS* (Raine et al. 2018) o *FACETS* (Shen y Seshan 2016), puesto que la mayoría de estos métodos han sido diseñados para procesar datos procedentes de la secuenciación de exomas o genomas y en este trabajo se había secuenciado un panel de 46 genes. En consecuencia, no había suficiente densidad de *SNP* en heterocigosis para poder calcular la pureza con suficiente potencia estadística.

Por otro lado, las muestras empleadas no han sido en fresco, sino que procedían de bloques de parafina. Como ya se ha comentado, el empleo de la parafina introduce sustituciones de tipo *C>T* (Xuan et al. 2013) coincidiendo con el tipo de alteración genética que se quiere estudiar para conocer el efecto de la *RUV* en el proceso mutacional. Por este motivo, al realizar el protocolo bioinformático se ha añadido un paso de filtrado para poder eliminar dichas alteraciones. En el trabajo de Hu et al. (2021) se empleó el mismo tipo de bloques y en dicho estudio se describe que las alteraciones genéticas debidas a la parafina tienen una frecuencia baja, generalmente menor al 10% siendo el tipo predominante las transiciones de tipo *C>T*. En nuestro estudio, como estas transiciones son las que se quiere estudiar para conocer el impacto de la *RUV* sobre los tejidos, se ha realizado un filtrado un poco más estricto para estas mutaciones en concreto, exigiendo así un número de lecturas ≥ 15 .

Además, es importante destacar que según los autores del programa bioinformático *dNdS* (Martincorena et al. 2017), en el caso de analizar cualquier tipo de cáncer de piel, los resultados obtenidos pueden estar infraestimados. Esto se debe a que este software estudia el modelo trinucleótido, es decir, la mutación y el nucleótido de antes y el de después de ella; y la firma mutacional inducida por la *RUV* se extiende más allá de dicho modelo (Martincorena et al. 2017). Esto se debe a que, aunque la *RUV* forma de dímeros de pirimidina y ciclobutano, también forma lesiones más grandes que un trinucleótido dado que se pueden unir a pirimidinas vecinas dando cambios *C>T* o *CC>TT*, e incluso cambios más largos. Por tanto, este segundo caso ya quedaría fuera del modelo trinucleótido estudiado. En consecuencia, el modelo de análisis de firma mutacional en el que se analizan los trinucleótidos no es el más adecuado para estudiar esta firma mutacional (Lindberg et al. 2019).

En conclusión, tanto en el melanoma como en su lesión precursora, el nevus melanocítico, se observa la firma mutacional relacionada con la radiación ultravioleta lo que demuestra su efecto mutagénico antes de que se produzca la lesión maligna. Para la aparición de un melanoma, es necesaria la selección de clones portadores de mutaciones oncogénicas que no solo favorezcan la proliferación celular, sino que también permitan escapar al control del ciclo celular.

Referencias bibliográficas

- Carracedo Pérez A y Valle Velasco L. 2020. «Genes, herencia y cáncer. Farreras Rozman. Medicina Interna» *Elsevier*, 155: 1193-1210.
- Cosmic. (n.d.) "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer". Recuperado el 18 de marzo, 2021, de: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

- Davis Lauren E, Shalin Sara C. y Tackett Alan J. «Current state of melanoma diagnosis and treatment». *Cancer Biology & Therapy* 20(11):1366-1379.
- Goldsmith Lowell A., Katz Stephen I., Gilchrest Barbara A., Paller Amy S., Leffell David J. y Wolff Klaus. 2013. «Fitzpatrick. Dermatología en Medicina General». *Panamericana*.
- Cruz Hernández, Juan Jesús, César Rodríguez Sánchez, Elvira del Barco Morillo y Emilio Fonseca Sánchez. 2018. «Biología celular y molecular del cáncer. Oncología Clínica». *Elsevier*
- Hernando Bárbara, Dietzem M., Parra G., Gil-Barrachina Marta, Pitarch Gerard, Mahiques Laura, Valcuende-Cavero Francisca y McGranahan Nicholas, Martínez-Cadenas Conrado. 2020. «The effect of age on the acquisition and selection of cancer driver mutations in sun-exposed normal skin». *Annals of Oncology* 32(3):412-421.
- Hu Xin, Fujimoto Junya, Ying Lisha, Fukuoka Junya, Ashizawa Kazuto y Sun Wenyong. 2019. «Multi-region exome sequencing reveals genomic evolution from preneoplasia to lung adenocarcinoma ». *Nature Communications* 10(1):1-10.
- Hu, Xin, Junya Fujimoto y otros. 2019. «Multi-region exome sequencing reveals genomic evolution from preneoplasia to lung adenocarcinoma ». *Nature Communications* 10(1):1-10.
- Jorde Lynn, Carey J. C. y Bamshad M. J. 2021 «Genética» *Elsevier*.
- Kierszenbaum Abraham L. y Tres Laura L. 2020. «Señalización celular. Biología celular patológica. Histología y biología celular». *Elsevier*, 3:99-134.
- Lindberg Markus, Boström Martin, Kerryn Elliott y Larsson Erik. 2019. «Intragenomic variability and extended sequence patterns in the mutational signature of ultraviolet light». *PNAS* 116(41):20411-7.
- Liu, Fenglin, Yuanyuan Zhang, Lei Zhang, Ziyi Li, Qiao Fang, Ranran Gao y Zemin Zhang. 2019. «Systematic comparative analysis of single-nucleotide variant detection methods from single-cell RNA sequencing data» *Genome Biology* 20:242.
- Martincorena, Íñigo, Keiran M. Raine, Moritz Gerstung, Kevin J. Dawson, Kerstin Haase, Peter Van Loo, Helen Davies, Michael R. Stratton, Peter J. Campbell. 2017 «Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues». *Cell*, 171:1029-1035.
- National Cancer Institute (n.d.). Recuperado el 25 de febrero, 2021 de: <https://www.cancer.gov/>.
- Pich Oriol, Muiños Ferran, Lolkema Martijn P., Steeghs Neeltje y Gonzalez Abel 2020. «Europe PMC Funders Group The mutational footprints of cancer therapies». *Nature Genetics* 51(12):1732-1740.
- Raine Keiran M., Van Loo Peter, Wedge David C., Jones David, Menzies Andrew... y Butler Adam P. 2018. «Europe PMC Funders Group ascatNgs: Identifying Somatic Acquired Copy-Number Alterations from Whole-Genome Sequencing Data Basic Protocol : Calling Copy Number Segments with a Single Command for a Tumor / normal Sample Pair». *Current Protocols in Bioinformatics* 1-24.
- Rosenthal Rachel, McGranahan Nicholas, Herrero Javier, Taylor Barry S. y Swanton Charles. 2016. «deconstructSigs: Delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution». *Genome Biology* (1):1-11.

- Shain Alan H, Yeh Iwei, Kovalyshyn Ivanka, Sriharan Aravindhan, Talevich Eric ... y Gagnon Alexander. 2015. «The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions». *The New England Journal of Medicine* 373(20):1926-1936.
- Shain, Alan Hunter y otros. 2015. «The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions». *The New England Journal of Medicine* 373(20):1926–1936.
- Shen Ronglai y Seshan Venkatraman E. 2016. «FACETS: Allele-specific copy number and clonal heterogeneity analysis tool for high-throughput DNA sequencing». *Nucleic Acids Research* 44(16):1-9.
- Stratton Michael R., Campbell Peter J. y Futreal Andrew P. 2019. «The cancer genome». *Nature* 458(7239):719-724.
- Tang Jessica, Fewings Eleanor, Chang Darwin, Zeng Hanlin, Liu Shanshan ... y Jorapur Aparna. 2020. «The genomic landscapes of individual melanocytes from human skin». *Nature* 586(7830):600-605.
- Tang, Jessica, Eleanor Fewings y otros. 2020. «The genomic landscapes of individual melanocytes from human skin». *Nature* 586(7830):600–605.
- Xuan Jiekun, Yu Yin, Qing Tao, Guo Lei y Shi Leming. 2013. «Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. Cancer Letters». *Elsevier Ireland Ltd*, 340(2):284-95.