

# Predisposición hereditaria de padecer melanoma en familias uruguayas.

## Resultados preliminares

Dres. Alejandra Larre Borges García\*, Malena Scarone†, Lucía Delgado‡, Jimena Núñez§, Mercedes Laporte¶, Graciela Fernández††, Carlos Bazzano‡‡, Miguel Martínez Asuaga§§

Departamento Básico de Medicina - Cátedra de Dermatología - Servicio de Oncología Clínica. Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República (Uruguay)

### Resumen

**Introducción:** *el melanoma cutáneo es el cáncer cuya incidencia presenta la mayor tasa de crecimiento en el mundo. Su tasa de mortalidad no ha disminuido pese a las terapias costosas empleadas para su diagnóstico y tratamiento. Puede presentarse bajo dos formas: esporádica y hereditaria. Esta última incluye a individuos con alto riesgo de desarrollar melanoma, variando su frecuencia según la población estudiada.*

**Objetivos:** *el objetivo general del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la predisposición hereditaria de padecer melanoma en Uruguay. Material y método: mediante la aplicación de un formulario de tamizaje se identificaron 14 familias con alto riesgo de padecer melanoma hereditario. Diecisiete pacientes integrantes de ellas dieron su consentimiento informado para investigar mutaciones de línea germinal en CDKN2A y CDK4. La detección de cambios genéticos se realizó mediante PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction - Single Stranded Conformational Polymorphism). Los fragmentos con un patrón de bandas de SSCP atípicos fueron analizados mediante secuenciación. Resultados: se identificaron dos mutaciones: una en el exón 2 de CDKN2A (E88X) en dos pacientes familiares de primer grado portadoras de melanomas múltiples y síndrome familiar de nevos atípicos (SFNA) y con historia familiar de melanoma y cáncer de páncreas. Esta mutación de línea germinal no ha sido descripta previamente en familias con melanoma. La otra mutación identificada (G101W) es una de las más frecuentes a nivel mundial. Ambas mutaciones fueron identificadas en pacientes con SFNA y múltiples melanomas en sus familias. La frecuencia de mutaciones encontrada concuerda con la documentada en estudios previos que utilizaron criterios de selección similares.*

**Palabras clave:** MELANOMA - epidemiología.  
SÍNDROMES NEOPLÁSICOS HEREDITARIOS.  
MUTACIÓN - genética.  
URUGUAY.

\* Asistente del Departamento Básico de Medicina y de la Cátedra de Dermatología.

† Ayudante de Clase del Departamento Básico de Medicina.

‡ Profesora Agregada del Servicio de Oncología Clínica y Coordinadora de la Unidad de Oncogenética del Hospital de Clínicas.

§ Ex Ayudante de Clase del Departamento Básico de Medicina.

¶ Ex Asistente de la Cátedra de Dermatología.

†† Ayudante de Investigación del Departamento Básico de Medicina.

‡‡ Profesor Adjunto de la Cátedra de Dermatología.

§§ Profesor Agregado de la Cátedra de Dermatología e integrante de la

Unidad de Melanoma del Hospital de Clínicas.

**Correspondencia:** Dra. Alejandra Larre Borges

Av. Italia s/n piso 1, Cátedra de Dermatología, y piso 15, Departamento Básico de Medicina. Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: alelarre@hc.edu.uy

Recibido: 18/9/06.

Aceptado: 29/12/06.

Esta investigación recibió financiación parcial por parte de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. De los resultados de la misma y de las opiniones expresadas en la presente publicación son responsables únicamente los autores.

## Introducción

El melanoma (MM) cutáneo es el cáncer cuya tasa de incidencia ha presentado el mayor crecimiento en el mundo. En 1935 el riesgo que una persona caucásica desarrollara MM en el curso de su vida era de uno en 1.500; en el año 2000 este se elevó a uno en 75. Por ello es considerado por el Centro para el Control de las Enfermedades de Estados Unidos como un fenómeno de proporciones epidémicas. En las formas invasivas la tasa de mortalidad no ha disminuido pese a los tratamientos sumamente costosos y agresivos ensayados en los últimos años, estando vinculada fundamentalmente al diagnóstico tardío, es decir un hecho modificable. En efecto, la supervivencia de cinco años en estadios avanzados es de 5%, mientras que en estadios tempranos con diagnóstico precoz es de aproximadamente 98%<sup>(1-3)</sup>. En Uruguay la tasa de incidencia ajustada por edad es de 3,1 cada 100.000 habitantes en hombres y 2,5 en mujeres<sup>(4)</sup>. El análisis de las tendencias en nuestro país de la tasa de mortalidad en el último decenio ha presentado cifras estables en hombres y un aumento de 2% anual –no significativo estadísticamente– en mujeres<sup>(5)</sup>.

En su etiopatogenia se reconocen múltiples factores que se intrincan en forma compleja y heterogénea. Así, los factores de riesgo más importantes fuertemente asociados con la aparición de melanoma pueden esquematizarse en ambientales e individuales. Los estudios epidemiológicos han confirmado que el factor ambiental de mayor importancia es la exposición intermitente e intensa a las radiaciones ultravioletas, particularmente en edades tempranas<sup>(6)</sup>. Los factores de riesgo individuales son: a) antecedentes personales o familiares, o ambos, de cáncer de piel; b) presencia de síndrome familiar de nevos clínicamente atípicos (SFNA), cuya expresión anatomopatológica es frecuentemente la displasia; c) fototipo bajo; d) síndromes hereditarios raros como el albinismo, xeroderma pigmentoso, síndrome de Li-Fraumeni<sup>(7)</sup>.

Los antecedentes familiares y personales de MM así como de síndrome de nevos atípicos en su variedad familiar son los factores de riesgo más relevantes<sup>(8-10)</sup>. Los individuos portadores de SFNA presentan una probabilidad de desarrollar melanoma a los 50 años de 49% y a los 72 años de 82%<sup>(11)</sup>. En diversas series entre 1% y 25% de los MM se desarrollan en individuos que presentan uno o más familiares de primer grado portadores de dicha enfermedad<sup>(12-17)</sup>. En países con una tasa de incidencia de melanoma intermedia, como la de Uruguay, el diagnóstico clínico de melanoma hereditario requiere la presencia de dos o más miembros de una familia con parentesco de primer o segundo grado afectados por MM invasivo<sup>(18)</sup>.

Los estudios realizados confirman la existencia de una herencia autosómica dominante, con penetración incom-

pleta. Hasta la fecha se han identificado dos genes de susceptibilidad, ambos relacionados con el control del ciclo celular: CDKN2A situado en el cromosoma 9p21-22 y CDK4, localizado en el brazo largo del cromosoma 12<sup>(19-21)</sup>. CDKN2A codifica dos transcritos alternativos para las proteínas supresoras de tumor porta p16 (PM 16 Kd) y p14<sup>ARF</sup> la cual se sintetiza a partir del mismo segmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) que p16, pero con un marco de lectura diferente (Alternative reading frame o ARF)<sup>(22-24)</sup>. Las mutaciones de línea germinal de CDKN2A también se asocian con un riesgo aumentado de cáncer de páncreas<sup>(25)</sup>. Por su parte, CDK4 codifica una quinasa dependiente de ciclina blanco de p16<sup>(26)</sup>. Las mutaciones de línea germinal en las regiones codificadoras de estos genes no explican todos los casos de melanoma hereditario, siendo las más frecuentemente implicadas las de CDKN2A (aproximadamente 25% de los casos de melanoma hereditario). Si bien las mutaciones en CDK4 varían en frecuencia y tipo en las diferentes poblaciones estudiadas, en términos generales se consideran raras<sup>(27-29)</sup>. Se postula que el resto de los casos de melanoma hereditario se debe a mutaciones en las regiones no codificantes de CDKN2A o CDK4, a mutaciones en otros genes, o a cambios postraduccionales<sup>(26,30-33)</sup>. La probabilidad de encontrar una mutación en CDKN2A depende de la población estudiada y de los criterios de selección utilizados y varía entre 1,5% y 50%<sup>(34)</sup>.

La identificación de familias con predisposición hereditaria a MM a través de las pesquisas clínica y molecular permitiría detectar precozmente una población de alto riesgo de desarrollar este cáncer, en la cual su estricto seguimiento puede ser de gran interés. Además, la identificación de los portadores y no portadores permitiría la racionalización de los controles clínicos y paraclínicos, adaptándolos al nivel individual de riesgo. Esto redundaría en una disminución de costos en salud mediante el empleo de una estrategia que además podría evitar el diagnóstico tardío y en consecuencia reducir el riesgo de recurrencia y mortalidad<sup>(34,35)</sup>.

En MM, estudios recientes del Melanoma Genetics Consortium han determinado que la penetración a lo largo de la vida de un individuo portador de mutaciones en CDKN2A varía según el área geográfica y grupo étnico en el cual se estudia. Esta variación sugiere que los factores ambientales y de comportamiento, además de la composición étnica local, contribuyen significativamente en la inducción de melanoma aun en presencia de mutaciones<sup>(36,37)</sup>. Por ello, el riesgo calculado de desarrollar MM antes de los 80 años en portadores de mutaciones en CDKN2A oscila entre 58% en Europa a 91% en Australia<sup>(17,35,38)</sup>.

El objetivo general de nuestro estudio fue contribuir al conocimiento de la predisposición hereditaria de padecer MM en nuestro país, determinando su fenotipo y genotipo.

## Material y método

A partir de un formulario de tamizaje distribuido a dermatólogos se seleccionaron individuos con edad igual o superior a 18 años, que respondían a alguno de los siguientes criterios de inclusión: a) tres o más miembros de la familia con MM; b) dos miembros de la familia con MM, uno de ellos con diagnóstico antes de los 50 años; c) un miembro de la familia con MM e historia familiar de síndrome de nevos atípicos; d) paciente menor de 30 años con MM invasivo; e) paciente con MM primitivos múltiples.

En todos los casos los pacientes fueron referidos a la Unidad de Oncogenética del Hospital de Clínicas. Durante la consulta oncogenética se completó una historia informatizada en la cual se consignó, entre otros datos clínicos, la presencia o ausencia de factores de riesgo no genéticos y se construyó el árbol genealógico de la familia, el cual se procesó utilizando el software Cyrillic II. Asimismo, se informó a los pacientes sobre la naturaleza de investigación de los estudios moleculares para la detección de mutaciones en CDKN2A y CDK4, el significado de un resultado positivo o negativo y los potenciales beneficios y limitaciones de los tests genéticos en la investigación de mutaciones en estos genes<sup>(34,35)</sup>.

Las muestras de sangre para los estudios moleculares se extrajeron en tubos con EDTA luego de obtener el consentimiento informado escrito.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas.

### Estudios moleculares

La investigación de mutaciones de línea germinal en CDKN2A y CDK4 fue realizada en el Laboratorio de Citometría de Flujo y Biología Molecular Prof. Dr. Roberto Caldeyro Barcia del Departamento Básico de Medicina (Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay) y los controles de calidad en el Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínic de Barcelona dirigido por la doctora Montserrat Milá.

La extracción de ADN se realizó según lo descrito en un estudio previo<sup>(40)</sup>.

La investigación de mutaciones en los genes CDKN2A y CDK4 se realizó mediante la técnica SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)<sup>(41)</sup>, previa amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) de todos los exones de p16 la mayor parte de p14<sup>ARF</sup>: 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 –dividido en dos sectores solapados–, y 3. También se analizó todo el exón 2 de CDK4, que es el único exón en el cual se han descrito mutaciones. Se utilizaron los primeros descriptos por Soufir<sup>(15)</sup>. La PCR se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l con 100 ng de ADN genómico, 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,4  $\mu$ M de cada primer y 0,2 unidades

de Taq ADN polimerasa (Promega) y de acuerdo con el siguiente protocolo: 1) etapa de desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos; 2) 34 ciclos a 95° C por 30 segundos, 57° C (exones 1 y 2b de CDKN2A y 2 de CDK4) y 58° C (exones 2a y 3 de CDKN2A) por 30 segundos y 72° C por 30 segundos. Luego de la amplificación los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,5%. Los productos de PCR se desnaturalizaron con calor (95° C durante 5 minutos) y formamida (98%) y una alícuota (5  $\mu$ l) se sembró en un gel de poliacrilamida a 8% de 30 x 40 cm. (Hoefer S Q 3 Sequencer), separándose los distintos productos mediante migración a 300V. Luego de la electroforesis los geles fueron fijados y teñidos con nitrato de plata según lo descrito por Holland y colaboradores<sup>(13)</sup>.

Los productos de PCR que presentaron un patrón de bandas atípico fueron secuenciados en el CTAG (Facultad de Ciencias, Universidad de la República) y en la Unidad de ADN del Hospital Clínic de Barcelona. La secuenciación fue realizada con el kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences) en un secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer.

## Resultados

Hasta la fecha se han incorporado al estudio 14 familias, realizándose la extracción de sangre para los estudios moleculares a 17 individuos pertenecientes a las mismas. En la tabla 1 se presentan los criterios de inclusión, las características clínicas y la historia familiar de los individuos estudiados. Siete de los 17 probandos presentaron fototipo I o II. De los 17 probandos, diez presentaron MM y siete fueron no portadores de MM con historia familiar de MM pero sin familiares afectados vivos. Del total de pacientes con MM, tres presentaron melanomas múltiples y seis síndrome familiar de nevos atípicos (SFNA). Entre los probandos afectados la edad al primer diagnóstico de MM varió entre 14 y 45 años (mediana: 30,5 años). Entre los no portadores de MM el número de probandos con SFNA fue de cinco. El número de casos de melanoma por familia varió entre uno y tres. Solamente en tres familias (tres probandos) ocurrieron tres casos de MM. Sólo una de las familias estudiadas presentó historia de cáncer de páncreas. Ninguna de las familias estudiadas presentó antecedentes de síndromes hereditarios como albinismo, xeroderma pigmentoso, síndrome de Li-Fraumeni.

En relación con el estudio molecular de CDKN2A, se detectó un patrón de bandas atípico en las pacientes cuatro y cinco, pertenecientes a la misma familia, a nivel del exón 2 de CDKN2A (figura 1). Dichas pacientes, madre e hija, presentaron MM múltiples y SFNA, falleciendo la madre a causa de un sarcoma. Entre los antecedentes familiares se destacan un primo abuelo de línea materna fallecido por melanoma a los 50 años y un tío por línea

**Tabla 1.** Criterios de inclusión, características clínicas e historia familiar de los probandos

Paciente	Criterio de inclusión	Edad al diagnóstico del melanoma	Fototipo	Fotoexposición	SFNA	MM y otros tumores en la familia
1	C y D	20 años F°22 años MM metastático	II	I e I	No	
2	C y E	34 y 52 años	III	I e I antes de los 20 años	Sí	
3	B	44 años	I	I e I	No	Hermano F°61 a MM Hermano F°62 a metástasis hepática de PD
4	A, C, D, E	29, 43, 45 años F°62 a por sarcoma	II	I e I en la infancia	Sí	MM: hija D°14 y 32; tía abuela materna F°50 Páncreas: tío materno F° 54 Metástasis PD: primo materno F°43
5	A, C, D, E	14 y 32 años	II	Escasa	Sí	Hija de paciente 4
6	A y C	42 años	III	I e I antes de los 20 años	Sí	MM: madre F° 68 y Hermana D° 33
7	A y C	No MM	IV	Escasa	No	Hijo de paciente 6
8	C	32 años	III	I e I	Sí	Nevos displásicos
9	C	No MM	II	I e I antes de los 20 años	Sí	MM: madre D°52
10	D	25 años	II	I e I antes de los 20 años	No	
11	C	No MM	III	I e I antes de los 20 años	Sí	MM: padre F°46
12	B y C	45 años	III	I e I	Sí	MM: hermana D°28
13	C	No MM	III	I e I antes de los 20 años	Sí	MM: hermana D°30 y tío abuelo paterno F°80 "Cáncer de piel": abuelo paterno D°86
14	D y E	28 años	II	I e I	No	
15	D y E	No MM	III	I e I	No	Hija de paciente 14
16	A y C	No MM	I	Escasa	Sí	MM: Madre, hermano y tía materna
17	C	No MM	III	Escasa	Sí	MM: Padre F°46

F°: fallecido/edad; SFNA: síndrome familiar de nevos atípicos; D°: diagnóstico/edad ; MM: melanoma; No MM: no presentaba melanoma; I e I: intensa e intermitente; PD: primitivo desconocido

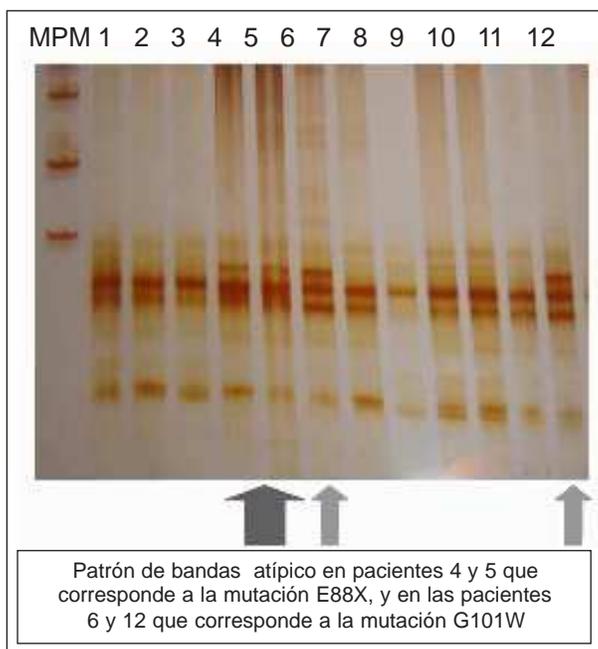
materna fallecido a los 54 años por cáncer de páncreas. El análisis de la secuencia de ADN nos permitió identificar un cambio de bases (guanina por timina) en el codón 88: E88X (figura 2). Este cambio de bases determina un codón stop prematuro en el transcritto para p16 mientras que en p14<sup>ARF</sup> no se traduce en un cambio en la proteína codificada. Esta mutación no ha sido descrita previamente en familias con melanoma hereditario. Además, se identificó otro patrón de bandas atípico que corresponde por secuenciación a la mutación G101W, una de las más fre-

cuentes a nivel mundial, en la paciente 6 –pero no en su hijo: paciente 7– y en la paciente 12.

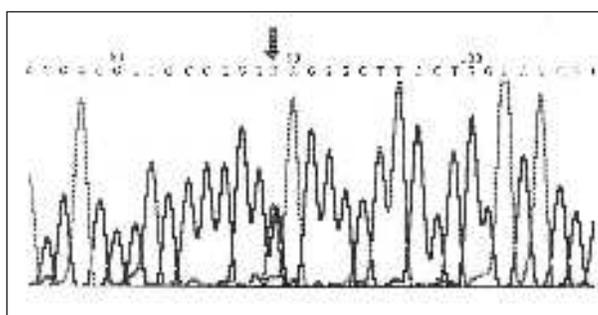
Por medio de la técnica de tamizaje utilizada no hemos encontrado ningún patrón atípico en el exón 2 de CDK4.

### Discusión y perspectivas

En las 14 familias analizadas hemos hallado dos mutaciones: una ya descrita y otra nueva, en los genes de suscep-



**Figura 1:** Fragmento de PCR-SSCP del exón 2 fragmento a pacientes 1 al 12



**Figura 2.** Análisis de secuencia del exón 2 de CDKN2A de la paciente 5. En la posición señalada por la flecha "N" puede corresponder a guanina (G) (secuencia normal) o a timina (T)

tibilidad estudiados, ambas en el exón 2 de CDKN2A, exón donde se han encontrado la mayor parte de las mutaciones en CDKN2A.

La mutación G101W, identificada en España y Francia, es la mutación más frecuentemente descrita a nivel mundial y se estima que su efecto fundador data de 97 generaciones atrás en el sudoeste de Europa<sup>(42)</sup>. Esta mutación fue encontrada en la paciente 6 pero no en su hijo, resultado de gran importancia para el mismo y su descendencia, ya que su riesgo de padecer melanoma es el de la población general. En cuanto a la paciente 12, sería importante realizar estudios moleculares a sus familiares con riesgo de ser portadores, incluida su hermana afectada por melanoma y la progeñie de ésta, ya que dados los antecedentes personales y familiares presenta alto riesgo de presentar la mutación G101W y, por tanto, de presentar nuevos melanomas, y su progeñie. No hemos encontrado en

la literatura trabajos previos sobre la mutación E88X en el melanoma hereditario, aunque sí en el melanoma esporádico. Sería de importancia investigar un posible efecto fundador al igual que en la mutación G101W<sup>(43)</sup>. Si bien nuestros resultados son preliminares, esta proporción es similar a la descrita en estudios de otras poblaciones en los que se utilizaron criterios de selección similares<sup>(44)</sup>.

La mutación identificada corresponde a un cambio de bases que determina la aparición de un codón de terminación prematura de la traducción y, en consecuencia, a la síntesis de una proteína truncada no funcionante. Se postula que serían factores ambientales, como las radiaciones ultravioletas, los que determinan la mutación del otro alelo de CDKN2A a nivel del melanocito blanco con la pérdida consiguiente de la función supresora de tumor asociada a CDKN2A.

La mutación de línea germinal descrita en el presente estudio fue identificada en madre e hija, ambas con múltiples melanomas primitivos y síndrome familiar de nevos atípicos y antecedentes familiares de melanoma y cáncer de páncreas. Recientemente se ha demostrado que la existencia de cuatro o más familiares de primer o segundo grado portadores de melanoma, o un miembro de la familia con tres o más melanomas primitivos, como es el caso de las pacientes 4 y 5, se correlaciona fuertemente con la presencia de mutaciones en CDKN2A<sup>(45)</sup>. En ambas pacientes el primer MM fue diagnosticado antes de los 30 años.

Los fototipos dominantes fueron el II-III (14 de 17) valor algo más bajo que el correspondiente a nuestra población. El antecedente de fotoexposición intensa e intermitente se registró en 13 de los 17 pacientes, predominando en la infancia. La presencia de un SFNA se halló en 10 de los 17 pacientes, una frecuencia muy superior a la observada en la población general<sup>(1,7)</sup>.

En cuanto a CDK4 la ausencia de un patrón de bandas atípico en el SSCP aleja la probabilidad de encontrar mutaciones en las familias estudiadas. Este resultado está de acuerdo con la baja frecuencia de mutaciones de línea germinal reportada para este gen.

La inclusión de un mayor número de familias y de integrantes de las familias ya tamizadas en el estudio nos permitirá correlacionar los hallazgos moleculares con las características clínicas de los pacientes estudiados y con su historia familiar, así como con la evolución clínica de la enfermedad. Además podremos valorar la epidemiología molecular del melanoma hereditario en nuestro país.

Por otra parte, la generación de una genoteca con las muestras de los pacientes incluidos en este estudio hará posible ampliar los estudios moleculares, previo consentimiento informado, con la finalidad de contribuir a la identificación de individuos con alto riesgo de melanoma y su inclusión en programas de detección oportuna y prevención adaptados a su nivel de riesgo.

## Agradecimientos

Agradecemos a los pacientes por su participación en este estudio.

A la Dra. Susana Puig del Hospital Clínic de Barcelona por abrirnos las puertas de la Unidad de Nevus y Melanoma y permitirnos realizar los controles de nuestras técnicas.

A los doctores Mariela Álvarez, Daniela Bravo, José Bruno, Alba Centurión, Griselda de Anda, Daniela De Boni, Fernando Della Santa, Ana Durán, José Espasandín, Rodrigo Fresco, Victoria González, Mabel Guillén, Susana Lacuesta, Mónica Santurión y Alejandra Yusín por su colaboración en la identificación de los pacientes con riesgo genético.

A la Dra. Daniela Lens, a la Lic. Andreína Brugnini y al Dr. José Tort por su colaboración en el análisis de las secuencias.

## Summary

Cutaneous melanoma is the cancer whose incidence has the highest growing rates worldwide. Mortality rates have not decreased in spite of diagnostic and management therapies. There are two expressions of melanoma: sporadic and hereditary forms. The latest include persons with high risk to develop melanoma, whose frequency varies according to the studied population. The aim of this study is to analyze hereditary predisposition of melanoma in Uruguay. Fourteen families with high risk of hereditary melanoma were identified using a sift questionnaire. Search for germline mutations in CDKN2A and CDK4 was performed in 17 patients of these families who gave informed consent using PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction - Single Stranded Conformational Polymorphism). Fragments with atypical SSCP patterns were analyzed by sequencing. Two mutations were identified; the first mutation in exon 2 of CDKN2A (E88X) in two first-degree relatives carriers of multiple melanomas and familial syndrome of atypical nevus (SFNA) with familial history of melanoma and pancreatic cancer (this germinal mutation has not been described in families with melanoma) and the second mutation (G101W) is one of the most frequent worldwide. Both mutations were identified in patients with SFNA and multiple melanoma within families. The frequency of these mutations is the same as reported in previous studies with similar selection criteria.

## Résumé

Le mélanome cutané est le cancer dont l'incidence présente le plus fort taux de croissance dans le monde entier. Son taux de mortalité n'a pas diminué malgré les thérapies coûteuses employées pour son diagnostic et traitement. Il peut se présenter de deux façons différentes: sporadique et héréditaire. Celle-ci comprend des individus qui ont un

grand risque de développer le mélanome, et sa fréquence varie selon la population étudiée. L'objectif général du présent travail est de contribuer à la connaissance de la prédisposition héréditaire de souffrir de mélanome en Uruguay. Moyennant l'application d'un formulaire de tri, on a identifié 14 familles ayant un haut risque de souffrir de mélanome héréditaire. Dix-sept patients intégrants de celles-ci ont donné leur accord informé pour chercher des mutations de ligne germinale à CDKN2A y CDK4. La détection de changements génétiques a été réalisée moyennant PCR-SSCP (Polymérase Chain Reaction - Single Stranded Conformational Polymorphism). Les fragments avec un patron de bandes de SSCP atypiques ont été analysés moyennant un séquençage. On a identifié deux mutations: une dans l'exon 2 de CDKN2A (E88X) chez deux patients parents au premier degré porteuses de mélanomes multiples et de syndrome familial de nævus atypiques (SFNA) et avec une histoire familiale de mélanome et de cancer au pancréas. Cette mutation de ligne germinale n'a pas été préalablement décrite chez des familles avec mélanome. L'autre mutation identifiée (G101W) est l'une des plus fréquentes au niveau mondial. Les deux mutations ont été identifiées chez des patients avec SFNA et des multiples mélanomes dans leurs familles. La fréquence de mutations trouvée concorde avec celle documentée dans des études précédentes qui ont utilisé des critères similaires de sélection.

## Resumo

O melanoma cutâneo é o tipo de câncer cuja incidência apresenta a maior taxa de crescimento no mundo. Apesar dos tratamentos caros empregados em seu diagnóstico e tratamento sua taxa de mortalidade não diminui. Pode apresentar-se de duas formas: esporádica e hereditária. Esta última inclui indivíduos com risco alto de desenvolver, sendo que sua frequência varia segundo a população estudada. O objetivo geral deste trabalho é contribuir ao conhecimento da predisposição hereditária de desenvolver melanoma no Uruguai. Utilizando um formulário de triagem foram identificadas 14 famílias com risco alto de desenvolver melanoma hereditário. Dezesete pacientes integrantes destas famílias deram seu consentimento informado para pesquisar mutações na linha germinal em CDKN2A e CDK4. A detecção de alterações genéticas foi feita utilizando PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Stranded Conformational Polymorphism). Os fragmentos com um padrão de bandas de SSCP atípicos foram analisados por sequenciação. Foram identificadas duas mutações: uma no exon 2 de CDKN2A (E88X) em dois pacientes familiares em primeiro grau portadores de melanomas múltiplos e síndrome familiar de nevos atípicos (SFNA) e com história familiar de melanoma e câncer de pâncreas. Esta mutação da linha germinal ainda não tinha sido descrita em famílias com melanoma. A outra mutação identificada (G101W) é uma das mais frequentes

em todo o mundo. Ambas mutações foram identificadas em pacientes com SFNA e múltiplos melanomas em suas famílias. A frequência de mutações encontrada está de acordo com a descrita em estudos anteriores que utilizaram critérios de seleção semelhantes.

## Bibliografía

1. **Delgado L, Martínez M, Espasandín J, Priario J.** Melanoma cutáneo. In: Musé I, Viola A, Sabini G ed. Aspectos prácticos de la oncología clínica. Montevideo: Sudamericana, 2004: 381-95.
2. **Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA.** Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8-31.
3. **Diepgen TL, Mahler V.** The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 2002; 146 (Suppl 61): 1-6.
4. **Barrios E, Vasallo J, De Stéfani E.** Patterns of cutaneous malignant melanoma incidence and mortality in Uruguay. *Melanoma Res* 2001; 11(Suppl 1): S138.
5. **Priario J.** Historia del melanoma maligno en Uruguay. *Rev Med Urug* 2005; 21: 255-68.
6. **Kraehn M, Scharl M, Peter R.** Human melanoma: a genetic disease? *Cancer* 1994; 75: 1228-37.
7. **MacKie RM.** Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer* 1998; 34 (Suppl 3): S3-S6.
8. **Greene M.** The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* 1999; 86: 2464-77.
9. **Goldstein AM, Tucker MA.** Genetic epidemiology of familial melanoma. *Dermatol Clin* 1995; 13: 605-12.
10. **Aitken JF, Duffy DL, Green A, Youl P, MacLennan R, Martin NG.** Heterogeneity of melanoma risk in families of melanoma patients. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 961-73.
11. **Slade J, Marghoob AA, Salopek TG, Rigel DS, Kopf AW, Bart RS.** Atypical mole syndrome: risk factor for cutaneous malignant melanoma and implications for management. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 479-94.
12. **Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, et al.** CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 446-52.
13. **Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ.** CDKN2A (P16<sup>INK4a</sup>) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 339-48.
14. **Hashemi J, Platz A, Ueno T, Stierner U, Ringborg U, Hansson J.** CDKN2A germ-line mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas. *Cancer Res* 2000; 60: 6864-7.
15. **Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombléd J, Spatz A, et al.** Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 209-16.
16. **Newton Bishop JA, Harland M, Bennett DC, Bataille V, Goldstein AM, Tucker MA, et al.** Mutation testing in melanoma families: INK4A, CDK4 and INK4D. *Br J Cancer* 1999; 80: 295-300.
17. **Landi MT, Goldstein AM, Tsang S, Munroe D, Modi W, Ter-Minassian M, et al.** Genetic susceptibility in familial melanoma from northeastern Italy. *J Med Genet* 2004; 41: 557-66.
18. **Fraser MC, Goldstein AM, Tucker MA.** The genetics of melanoma. *Semin Oncol Nurs* 1997; 13: 108-14.
19. **Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, Kumar R, Talve L, Hahka-Kemppinen M, et al.** Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 404-14.
20. **Nam J.** Interval estimation and significance testing for cyclic trends in seasonality studies. *Biometrics* 1995; 51: 1411-7.
21. **Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al.** Germline mutations in the p16<sup>INK4a</sup> binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; 12: 97-9.
22. **Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, et al.** Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 1992; 258: 1148-52.
23. **Plna K, Hemminki K.** Re: High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4): 323-5.
24. **Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Masback A, et al.** High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1260-6.
25. **Lynch HT, Brand RE, Hogg D, Deters CA, Fusaro RM, Lynch JF, et al.** Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer* 2002; 94: 84-96.
26. **Goldstein AM, Chidambaram A, Halpern A, Holly EA, Guerry IV D, Sagebiel R, et al.** Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma Res* 2002; 12: 51-5.
27. **Pollock PM, Stark MS, Palmer JM, Walters MK, Aitken JF, Martin NG, et al.** Mutation analysis of the CDKN2A promoter in Australian melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32: 89-94.
28. **Aitken JF, Green A, MacLennan R, Jackman L, Martin NG.** Comparability of surrogate and self-reported information on melanoma risk factors. *Br J Cancer* 1993; 67: 1036-41.
29. **Goldstein AM, Struewing JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA.** Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1006-10.
30. **Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W.** Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16(p16-Leiden). *Int J Cancer* 2000; 87: 809-11.
31. **Battistutta D, Palmer J, Walters M, Walker G, Nancarrow D, Hayward N.** Incidence of familial melanoma and MLM2 gene. *Lancet* 1994; 344: 1607-8.
32. **Laud K, Kannengiesser C, Avril MF, Chompret A, Stoppa-Lyonnet D, Desjardins L, et al.** French Hereditary Melanoma Study Group. BRAF as a melanoma susceptibility candidate gene? *Cancer Res* 2003; 63: 3061-5.
33. **Meyer P, Klaes R, Schmitt C, Boettger MB, Garbe C.** Exclusion of BRAFV599E as a melanoma susceptibility mutation. *Int J Cancer* 2003; 106: 78-80.
34. **de Snoo FA, Bergman W, Gruis NA.** Familial melanoma: a complex disorder leading to controversy on DNA testing. *Fam Cancer* 2003; 2: 109-16.
35. **Statement of the American Society of Clinical Oncology: genetic testing for cancer susceptibility.** Adopted on February 20, 1996. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1730-6.
36. **Tsao H, Niendorf K.** Genetic testing in hereditary melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 803-8.
37. **Marsh D, Zori R.** Genetic insights into familial cancers: update and recent discoveries. *Cancer Lett* 2002; 181: 125-64.
38. **Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, Berwick M, Halpern AC, Patel A, et al.** Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA* 2005; 294: 1647-54.
39. **Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, et al.** Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3043-51.
40. **Delgado L, Fernández G, González A, Bressac-de Paillerets B, Gualco G, Bombléd J, et al.** Hereditary breast cancer associated with a germline BRCA2 mutation in identical female twins with similar disease expression. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 133: 24-8.
41. **Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T.** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-70.
42. **Ciotti P, Struewing JP, Mantelli M, Chompret A, Avril MF, Santi PL, et al.** A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 311-9.
43. **Levanat S, Situm M, Crnic I, Marasovic D, Puizina-Ivic N, Pokupic N, et al.** Alterations in CDKN2A locus as potential indicator of melanoma predisposition in relatives of non-familial melanoma cases. *Croat Med J* 2003; 44: 418-24.
44. **Huber J, Ramos ES.** The P48T germline mutation and polymorphism in the CDKN2A gene of patients with melanoma. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 237-41.
45. **Eliason MJ, Larson AA, Florell SR, Zone JJ, Cannon-Albright LA, Samlowski WE, et al.** Population-based prevalence of CDKN2A mutations in Utah melanoma families. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 660-6.