

## **Estudio citogenético en sangre periférica de pacientes con melanoma.**

*Sandra Rondón, Nelson Rangel y Sandra Ramírez.*

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina,  
Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

**Palabras clave:** Melanoma, citogenética, anomalías cromosómicas.

**Resumen.** En Colombia el melanoma es la principal causa de muerte por enfermedades dermatológicas (40%) y representa el 1% del total de muertes por cáncer. El rápido incremento en la incidencia del melanoma hace necesaria la realización de estudios que permitan entender mejor los mecanismos implicados en su génesis y progresión. En este estudio se determinaron anomalías cromosómicas en sangre periférica de 30 pacientes con melanoma y en 23 individuos control mediante Citogenética Convencional (Bandeo G), observándose alta incidencia de anomalías numéricas y baja incidencia de rearrreglos estructurales recurrentes, siendo las pérdidas cromosómicas las alteraciones prevalentes en todos los estadios tumorales estudiados. El análisis citogenético de los pacientes mostró que, los cromosomas X, 9 y 17 fueron los más frecuentemente afectados. De las anomalías numéricas las monosomías de los cromosomas X y 17 y la trisomía formada por un cromosoma marcador fueron las más frecuentes, en estadios tempranos y tardíos de la enfermedad. Deleciones y translocaciones se presentaron como anomalías únicas. En el grupo control ningún tipo de anomalía fue identificada, y se observó bajo porcentaje de fragilidades en comparación con el grupo de pacientes. En comparación con los controles se observó alta frecuencia de anomalías cromosómicas en los pacientes, lo que sugiere la existencia de heterogeneidad y predisposición genética en el desarrollo de la enfermedad, que con investigaciones adicionales deben ser analizadas y validadas como posibles fuentes de marcadores moleculares, útiles para el diagnóstico temprano, tratamiento y seguimiento de la enfermedad.

**Cytogenetic study in peripheral blood of melanoma patients.***Invest Clin 2009; 50(2): 173 - 186***Key words:** Melanoma, cytogenetic, chromosomal anomalies

**Abstract.** Among all the skin diseases, melanoma is the main cause of death in Colombia (40 %) and it represents 1 % of all deaths by cancer. Due to the fast increase in the incidence of melanoma, it is necessary to carry out research on the mechanisms involved in its genesis and progression. This study determined chromosomal anomalies from peripheral blood samples on 30 patients with melanoma and on 23 control subjects using conventional cytogenetics (G Banded), where a high incidence in numerical anomalies and a low incidence in recurrent structural rearrangements were observed. Chromosomal losses were prevalent in all the tumor stages studied. The analysis showed that the chromosomes X, 9 and 17 were mainly affected. Among the numerical anomalies, monosomies in X and 17 chromosomes, as well as trisomies formed by a marker chromosome, were the most common in both early and late stages of the disease. Deletions and chromosomal crossovers appeared to be as isolated anomalies. In the control group no anomaly was identified, and a low percentage of fragility was observed when compared with the patients group. A high frequency in chromosomal anomalies was observed in patients, in contrast with the control subjects. This suggests the existence of heterogeneity and genetic predisposition during the illness development. To further research, these must be analyzed and validated as possible sources of molecular markers, which could be of use for the early diagnosis, treatment and follow up of the disease.

*Recibido: 17-04-2008. Aceptado: 09-10-2008*

**INTRODUCCIÓN**

El melanoma es considerado en algunos países (Estados Unidos y Australia) problema de salud pública, al extremo de catalogarse epidemia, debido al aumento en la incidencia y tasas de mortalidad en los últimos años (1). Según la IARC (Internacional Agency Research of Cancer) en Colombia se registraron 889 casos de melanoma en el año 2002, alcanzando tasas de mortalidad aproximadas del 23% (2). En el Instituto Nacional de Cancerología (Bogotá D.C), se registraron en el año 2001 95 casos nuevos de melanoma maligno mientras que para el 2002 fueron 151, siendo la principal causa

de muerte por enfermedades dermatológicas (40%) y representando el 1% del total de muertes por cáncer (3). Estas cifras no parecen tan alarmantes, sin embargo se sabe que existe un subregistro en países como Colombia y que la enfermedad alcanza altas tasas de incidencia a nivel mundial, por lo tanto el estudio e investigación en melanoma facilita la generación de conocimiento sobre los mecanismos que intervienen en el desarrollo y evolución de esta enfermedad.

El cáncer, en general, se produce por la acumulación de eventos moleculares al interior de las células, que conducen bien sea a la alteración de la información genéti-

ca o a la manera como ésta se regula, interfiriendo con el funcionamiento normal de la célula, en este caso los melanocitos. Estos cambios se asocian frecuentemente con alteraciones en genes relacionados con el mantenimiento de la integridad del ADN, la apoptosis y la proliferación celular. Algunos de estos pueden ser, proto-oncogenes, genes supresores de tumor o genes que intervienen en los procesos de reparación de daños a nivel del ADN, como por ejemplo LODC1 (Xq25) (15), CDKN2A (9p21)(6) y p53 (17p21). Por lo tanto, la activación y/o inactivación de estos genes por alteraciones cromosómicas (translocaciones, inversiones y deleciones) originadas por exposición a factores físicos, químicos y biológicos, pueden constituirse ya sea en un factor desencadenante del melanoma, un indicador de la progresión de la enfermedad o en un determinante de la respuesta al tratamiento (4).

Los análisis citogenéticos han contribuido a la identificación de regiones cromosómicas frecuentemente alteradas en pacientes con cáncer, en melanoma particularmente se reportan cariotipos variados y complejos con alta prevalencia de anomalías numéricas, poca recurrencia de anomalías estructurales (5), y asociación de las monosomías con el inicio y progresión del melanoma (4, 6). Este tipo de análisis favorece la identificación de secuencias genómicas con información útil para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad.

Entre las anomalías numéricas reportadas más comunes se encuentran la pérdida de los cromosomas 9 (4-6) y 10, ganancia de los cromosomas 7, 20, 22 y X (5) y en menor frecuencia anomalías estructurales de los cromosomas 7, 9 (afectando 9p), 11 y 17. Las deleciones del cromosoma 9 se encuentran asociadas a las etapas iniciales del melanoma (7-9). Las anomalías estructurales descritas con mayor frecuencia son: duplicaciones en 1p36, deleciones y translo-

caciones en 9p, deleciones de 10q23-26, deleciones de 6q, dicéntricos de los cromosomas 1p10 y 11p14 y derivados de los cromosomas 4p14, 9p12, 14q12, 9p21, 19p13.3, 10q31, 19q13 y 20q13.3 (10).

En el presente trabajo se describen las anomalías cromosómicas encontradas en sangre periférica de un grupo de pacientes con melanoma maligno en comparación con un grupo de personas sin ningún tipo de cáncer mediante técnicas de citogenética convencional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población de estudio

Se incluyeron en el estudio, 30 pacientes con melanoma, sin restricción de edad, sexo, raza; entre los 22 y 86 años de edad y sin tratamiento previo (quimioterapia, radioterapia o terapia hormonal). Los pacientes fueron contactados en las unidades de dermatología, seno y tejidos blandos del Instituto Nacional de Cancerología (INC) Bogotá; Colombia, en donde se les realizó el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad. El grupo control estuvo constituido por 23 individuos sanos sin ningún tipo de cáncer, los cuales cumplieron con características de género, edad y condición socioeconómica semejantes a las de los pacientes. Todos los participantes firmaron consentimiento informado aprobado tanto por el comité de ética de la Universidad del Rosario como por el comité de ética e investigaciones del Instituto Nacional de Cancerología.

### Procedimiento

A todos los participantes se les tomó una muestra de 5 mL de sangre con heparina como anticoagulante. Las muestras fueron cultivadas a 37°C por 72 horas en medio MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 µL de fitohemaglutinina. Al cabo de las 72 horas las células se trata-

ron con colchicina (0,0001 g/mL) durante 45 minutos para bloquear la citocinesis, luego se adicionó solución hipotónica (KCl 0,075 M) para lisar los eritrocitos, posteriormente fueron fijadas en solución 3:1 de metanol: ácido acético (fijador carnoy), lavadas tres veces con fijador carnoy y extendidas sobre láminas de vidrio. Después de secar al aire, las láminas fueron bandeadas (bandas G) y teñidas con solución colorante Giemsa para el análisis de anomalías cromosómicas, fragilidades y roturas.

#### Análisis cromosómico

En el microscopio se seleccionaron de 13 a 100 metafases por paciente, la diferencia en el número de células analizadas se debió al bajo porcentaje de metafases obtenidas en algunos de los pacientes y controles estudiados. Se analizaron metafases con buena dispersión y morfología, y se determinaron anomalías numéricas y/o estructurales, fragilidades y roturas. Las anomalías observadas fueron consideradas como clonales cuando se presentaron mínimo 2 veces en el total de células analizadas.

#### Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de independencia de ji ( $\chi^2$ ) cuadrado a las anomalías numéricas, anomalías estructurales, fragilidades y roturas que se presentaron con mayor frecuencia, para muestras de sangre periférica de los pacientes y del grupo control. Valores de p menores a 0,05 ( $P < 0,05$ ) fueron considerados como significativos en todas las pruebas. Los análisis se realizaron usando el programa estadístico Statistix 8.0.

### RESULTADOS

En total fueron analizadas por citogenética 30 muestras de pacientes de los dos géneros, con edades entre los 22 y 86 años. El diagnóstico clínico e histopatológico de

los pacientes con melanoma incluidos en el estudio se describe en la Tabla I.

En el análisis cromosómico se analizaron de 13 y 100 metafases por paciente, para un total de 1929 metafases estudiadas. En los cariotipos de los 30 pacientes con melanoma se observaron anomalías numéricas, estructurales, fragilidades y roturas en alta frecuencia, mientras que en el grupo control sólo se observaron algunas fragilidades y roturas. El 36,6% de los pacientes tenía cariotipo anormal y el 63,3% cariotipo normal (Tabla II).

En los cariotipos anormales se identificaron anomalías numéricas en mosaico del tipo monosomías, trisomías, y poliploidías. Las anomalías estructurales se observaron sólo una vez por paciente y su presencia no fue estadísticamente significativa; adicionalmente se observaron fragilidades y roturas cromosómicas y cromatídicas.

#### Anomalías numéricas

De 1929 metafases analizadas, 107 tuvieron anomalías cromosómicas numéricas: 73 metafases con monosomías, en donde la más frecuente fue la del cromosoma X (45, X, -X o 46, Y, -X), que se identificó en 8 pacientes con edades entre los 36 y 83 años (26,66%), siendo estadísticamente significativa ( $P = 0,0072$ ). Así mismo se encontró que 25 metafases tenían trisomías, siendo la más frecuente la trisomía del cromosoma X (47, XX, +X o 47, XY, +X) presente en 4 pacientes (13,33%). También se observó la presencia de un cromosoma marcador (47, XX, + mar o 47, XY, +mar) en 9 pacientes (30%), mostrando diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el grupo control ( $P = 0,0039$ ). Monosomías de los cromosomas X y 17 se observaron tanto en estadios tempranos como tardíos de la enfermedad. En el grupo control no se observaron anomalías numéricas (Tabla III).

**TABLA I**  
GRADO DE DESARROLLO Y TIPO HISTOLÓGICO DE LOS MELANOMAS EN EL GRUPO DE PACIENTES PARTICIPANTES

Tipo histológico	Nº de Pacientes	%
Melanoma <i>in situ</i>	3	10
Melanoma lentiginoso ACRAL		
Grado I A	1	3,33
Grado I B	2	6,66
Grado II A	1	3,33
Grado III A	1	3,33
Grado III B	1	3,33
Grado III C	2	6,66
Grado IV	2	6,66
Melanoma nodular		
Grado II A	1	3,33
Grado III A	1	3,33
Grado III B	3	10,00
Grado III C	2	6,66
Melanoma extensión superficial		
Grado IV	1	3,33
Melanomas clasificación no determinada		
No determinado	9	30,00
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100,00</b>

### Anomalías estructurales

En total se encontraron 65 metafases con anomalías estructurales, correspondientes a 19 pacientes (63,33%), estas anomalías sólo se observaron una vez y se presentaron como anomalías únicas. Entre ellas se identificaron: deleciones, derivados, duplicaciones, translocaciones e inversiones. Las anomalías más frecuentes fueron las deleciones (67,69%), seguidas por las translocaciones (16,92%). Las deleciones fueron principalmente del cromosoma 1 afectando las regiones 1p12 y 1q11 y del cromosoma 9 afectando las regiones p11, p21, q11. No se observaron anomalías estructurales, ni anomalías estructurales en mosaico con significancia estadística (Tabla IV y Fig. 1).

### Fragilidades

En las 1929 metafases analizadas se encontró un total de 233 fragilidades, siendo las más frecuentes 9q12, 3p12 1q11 y 9q11 en el 70%, 13,33% y 10% de los pacientes respectivamente; mientras que en el grupo control se encontraron 22 fragilidades, donde la más frecuente fue la del cromosoma 9q12 en 7 individuos (30,43%). No se observaron fragilidades en los demás cromosomas. El análisis estadístico del número de fragilidades arrojó diferencias significativas tanto entre el número de afectados que portan la fragilidad 9q12 como en el número de metafases con la misma, lo cual permite considerar entonces esta región, como un sitio frágil con alta sensibilidad para muestras de sangre periférica de pacientes con melanoma (Tabla V y Fig. 2).

**TABLA II**  
**CARIOTIPO POR PACIENTE, EDAD Y NÚMERO DE METAFASES LEÍDAS**

Código	Edad	Metafasas analizadas	ISCN 2005 *** Cariotipo
MEL 48	83	37	45,X,-Y[3]/46,XY[33]
MEL 47	66	100	46, XY,16qh+
MEL 46	66	36	46,XX,9qh+
MEL 45	82	31	46,XX
MEL 43	22	71	45,X,-X(4)/46,XX(63)
MEL 42	57	50	45,X,-X(4)/46,XX(45)
MEL 44	51	77	46,XX
MEL 40	76	70	46, XY
MEL 39	65	64	45, X,-X [3]/46, XX [60]
MEL 38	75	36	46,XY,22 pstk+
MEL 37	71	100	45,XX,-16[2]/45,XX,-17[2]/45,XX,-19[2]/46,XX[91]
MEL 35	18	100	45,XX,-10[2]/45,XX,-20[2]/45,XX,-21[2]/46,XX[88]
MEL 34	67	68	46,XY
MEL 33	86	100	46,XY
MEL 31	73	100	46,XY
MEL 30	78	100	46,XY
MEL 29	78	100	92,XXXXX(4)/45,XX,-X(2)/45,XX,-6(2)/46,XX(84)
MEL 28	52	22	46,XY
MEL 25	64	52	46,XY
MEL 24		44	45,XX,-12[2]/46,XX[42]
MEL 23		13	46,XY
MEL 21	64	59	46,XY
MEL 20	86	43	46,XY
MEL 19	36	58	45,X,-X(3)/45,XX,-17(2)/46,XX(52)
MEL 18	62	15	45,XY,-17(2)/46,XY(12)
MEL 17	63	100	47,XX,+X(2)/46,XX(92)
MEL 15	69	65	46,XY
MEL 14	52	18	46,XY
MEL 13	46	100	46,XY
MEL 12	22	100	46,XX

\*\*\* ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005).

**TABLA III**  
PRUEBA DE  $\chi^2$  PARA ANOMALÍAS NUMÉRICAS EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MELANOMA E INDIVIDUOS SANOS DETERMINADAS SOBRE EL NÚMERO DE PACIENTES

Monosomía/Trisomía	Pacientes	Controles	P
45, X/Y, -X	8	0	*0,0072
45, XX/XY, -6	3	0	0,1184
45, XX/XY, -12	3	0	0,1184
45, XX/XY, -17	4	0	0,0686
45, XX/XY, -18	4	0	0,0686
45, XX/XY, -21	3	0	0,1184
47, XX/XY, +X	4	0	0,0686
47, XX/XY, +mar	9	0	*0,0039
86-92 < 4n >	4	0	0,0686

\* P < 0,05.

**TABLA IV**  
FRECUENCIA DE ANOMALÍAS ESTRUCTURALES ENCONTRADAS POR CROMOSOMA, EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES (1929 metafases)

Cromosoma	Anomalía	Frecuencia	Código Paciente con la Anomalía
X	der(X)t(X;12)(p22;q13)	1	MEL 29
	del(X)(p?)	1	MEL 12
	del(X)(q22)	1	MEL 12
1	del(1)(p12)	3	MEL 44, MEL 14 (2)
	del(1)(q11)	3	MEL 38, MEL 33, MEL 31
2	del(2)(q11)	1	MEL 25
	del(2)(p15)	1	MEL 12
	del(2)(?)	1	MEL 25
	del(2)(q31)	1	MEL 15
	inv(2)(p15q27)	1	MEL 15
3	del(3)(p11)	1	MEL 17
4	del(4)(q13)	1	MEL 14
	del(4)(q24)	1	MEL 46
	del(4)(p12)	2	MEL 35 (1), MEL 31 (1)
	del(4)(p13)	1	MEL 30
	t(4;10)(q28;q25)	1	MEL 20
	del(4)(q21)	1	MEL 13

TABLA IV (Continuación)

Cromosoma	Anomalía	Frecuencia	Código Paciente con la Anomalía
	t(4;11)(q26;q24)	1	MEL 14
5	t(5;11)(q31;q14)	1	MEL 14
	del(5)(q24)	1	MEL 14
6	dup(6)(p22)	1	MEL 29
	del(6)(p11)	1	MEL 28
	del(6)(q11)	1	MEL 24
	del(6)(q12)	1	MEL 14
7	del(7)(p11)	1	MEL 17
	del(7)(p12)	1	MEL 15
	der(7;14)(q22;q23)	1	MEL 14
	t(7;18)(p14;p11)	1	MEL 14
8	del(8)(p21)	1	MEL 44
9	der(9)t(4;9)(q24;q12)	1	MEL 46
	t(9;12)(p11;q15)	1	MEL 33
	del(9)(p11)	1	MEL 29
	del(9)(p21)	1	MEL 13
10	del(10)(p11)	1	MEL 20
	t(10;16)(q25;q13)	1	MEL 14
	t(10;14)(q22;q12)	1	MEL 14
11	del(11)(q11)	1	MEL 34
	t(11;17)(p14;q21)	1	MEL 14
	del(11)(p11)	1	MEL 13
12	del(12)(q15)	1	MEL 33
	del(12)(p11)	1	MEL 25
	del(12)(p13)	1	MEL 20
	del(12)(q11)	2	MEL 14
13	del(13)(q14)	1	MEL 38
	del(13)(q21)	1	MEL 17
	der(13)t(6;13)(q12;q34)	1	MEL 14
	der(13)t(1;13)(p12;q34)	1	MEL 14
14	t(14;21)(q32;q22)	1	MEL 14
	t(14;15)(p11;p11)	1	MEL 43

TABLA IV (Continuación)

Cromosoma	Anomalía	Frecuencia	Código Paciente con la Anomalía
	der(14)t(7;14)(q11;p11)	1	MEL 17
	del(14)(q21)	1	MEL 17
16	der(16)t(4;16)(q21;q22)	1	MEL 13
	del(16)(q12)	1	MEL 29
	der(16)t(14;16)(q23;q23)	1	MEL 14
	del(16)(p11)	1	MEL 14
17	dup(17)(q22qter)	1	MEL 31
19	del(19)(p12)	1	MEL 14
20	del(20)(q11)	1	MEL 14
21	t(21;22)(p11;p11)	1	MEL 14

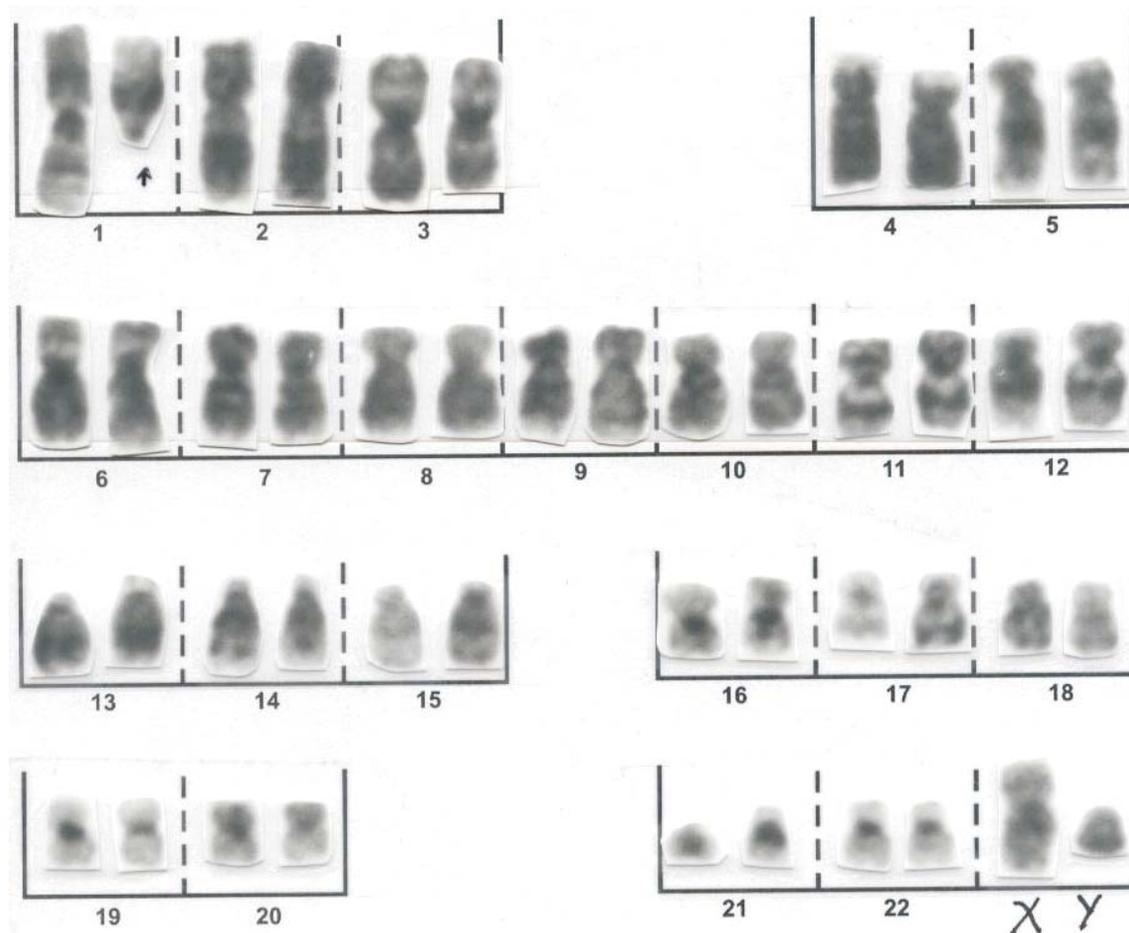


Fig. 1. Cariotipo representativo de las anomalías cromosómicas identificadas. Deleción del cromosoma 1 (46, XX, del (1)(q11)).

**TABLA V**  
PRUEBA DE  $\chi^2$  PARA FRAGILIDADES CROMOSÓMICAS CON MÁS ALTA FRECUENCIA  
EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MELANOMA E INDIVIDUOS CONTROL

Fragilidad	Pacientes n = 30		Controles n = 23		P
	#	%	#	%	
fra 9q12	21	70	7	30,43	0,0042*
fra 3p12	4	13,3	0	0	0,0686
fra 6p11	2	6.6	0	0	0,2068
fra 1q11	3	10	0	0	0,1184
fra 9q11	3	10	1	4,34	0,4401

\* P < 0,05.

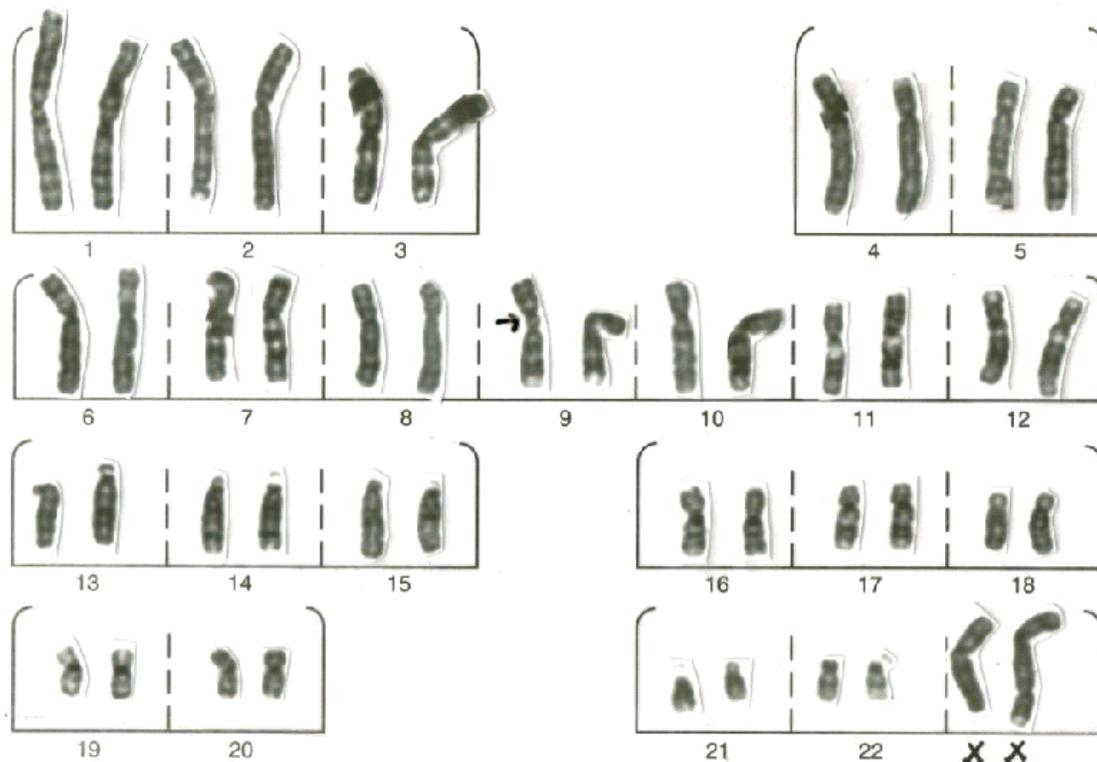


Fig. 2. Cariotipo representativo de fragilidad en el cromosoma 9 (46, XX, fra 9q12).

## DISCUSIÓN

En este estudio se determinaron varias anomalías cromosómicas en el cariotipo realizado a los 30 pacientes con melanoma, no identificadas en los 23 individuos sanos, sin ningún tipo de cáncer del grupo

control. Los análisis citogenéticos en el grupo de casos revelaron alta incidencia de anomalías numéricas pero baja incidencia de rearrreglos estructurales recurrentes, encontrándose que las pérdidas cromosómicas fueron las alteraciones más prevalentes en todos los estadios tumorales, he-

cho que puede estar relacionado con la posible progresión clonal de la enfermedad (5, 6, 11, 12).

También se halló una alta frecuencia de monosomías, principalmente de los cromosomas X y 17 y de trisomías de los cromosomas X. Estas anomalías y la presencia de un cromosoma marcador (cuya identificación no fue realizada en este estudio), fueron observadas tanto en estadios tempranos (*in situ*) como en estadios avanzados de la enfermedad (grados I a IV), siendo más frecuentes en estos últimos. En el 2005 el grupo de Wiltshire y colaboradores describieron la presencia de un cromosoma marcador en cariotipos de muestras de tejido tumoral de melanoma (5). En el cromosoma X se han identificado genes supresores de tumor como LDOC1 (Xq25), que tienen una expresión alterada en algunos tipos de cáncer (13-15), el gen ODZ1 (Xq25) que participa en eventos de transducción de señales durante la apoptosis, y los genes pertenecientes a la familia de antígenos asociados a melanoma *MAGEC1*, *MAGEC2*, *MAGEC3* y *MAGEE1*, los que solo se encuentran expresados en tejido tumoral incluyendo melanoma y son de particular importancia en el desarrollo de inmunoterapia antitumoral (15, 16). En el cromosoma 17 se encuentra el gen p53 (17q11) reconocido por su importante papel en mecanismos claves para la existencia de las células: proliferación, apoptosis, senescencia y reparación. Alteraciones en este gen se han reportado en el 50% de los cánceres (16). Estudios previos, también han reportado la presencia de monosomías del cromosoma X y las han asociado tanto con la iniciación como con la progresión del cáncer de piel del tipo melanoma (6). A pesar de no poderse determinar, en este estudio, a que regiones del genoma pertenecen los cromosomas marcadores observados, en varios estudios se ha establecido una asociación entre

la presencia de estos y el estadio metastásico de la enfermedad (17).

Las anomalías estructurales encontradas se presentaron como anomalías únicas observadas sólo una vez por paciente indicando la alta heterogeneidad de esta neoplasia, entre estas se identificó con mayor frecuencia la delección del cromosoma 1: 1p12, 1q12. Estas alteraciones han sido asociadas con tumores agresivos y tasas de supervivencia bajas (11). Las regiones del cromosoma 9 con delecciones (9p11, 9p21, 9q11 y 9q13), también se encontraron afectadas por fragilidades y roturas; y se han asociado a estadios avanzados de melanoma (6). Algunos estudios han descrito una correlación entre la pérdida de genes ubicados en el cromosoma 9 con el desarrollo de melanoma maligno (18-20). Una explicación podría ser el hecho de encontrarse en las regiones alteradas, genes con función oncosupresora, específicos de melanoma como por ejemplo p16 ubicado en 9p21. Aunque las anomalías estructurales no fueron recurrentes, se observaron regiones de algunos cromosomas afectadas más de una vez, entre las que se encuentran: 9p11, 12q11 y 13q34. Estas regiones contienen genes que desempeñan un papel importante en la generación o evolución de la neoplasia, como el factor de transcripción Dp1 (TFDP1) ubicado en 13q34, encargado de regular la expresión de varios promotores celulares implicados en el ciclo celular entre los que se encuentran la ciclina E, E2F1, Cdc2, ciclina A, DHFR y TK.

Una alta frecuencia de fragilidades fue observada en los cromosomas 9q12 (70%), 3p12 (13,33%), 1q11 y 9q11 (10%), en pacientes con melanoma. Estas regiones han sido asociadas con la presencia de genes supresores de tumor y genes reparadores de daño al ADN tales como *RECK*, *BAG1*, *BTEB1* (9q12) y *CDKN2A* (9p21) (6). Diferencias significativas de la presencia de la

fragilidad 9q12 ( $p = 0,000$ ) entre el grupo de casos comparado con el grupo control podría indicar la alta inestabilidad cromosómica en el genoma de estos pacientes, siendo este un hallazgo importante a tener en cuenta en la identificación de posibles marcadores relacionados con esta patología. Las anomalías del cromosoma 9 fueron las más frecuentes (76,6% de los pacientes), seguidas por las de los cromosomas X (30%), 1 (46,6%), 2 (43,3%), 6 (36,6) y 12 (33,3%). En el grupo control no se observaron anomalías numéricas ni estructurales, además se encontró un bajo porcentaje de fragilidades y de roturas comparadas con las observadas en los pacientes. Las fragilidades más frecuentes fueron la de los cromosomas 9q12 y 9q11 en el 30% y 4,34% de los individuos respectivamente; y las roturas fueron observadas principalmente en el cromosoma 9q12 en el 13,3% de los individuos control analizados.

El hallazgo de anomalías cromosómicas por citogenética convencional en sangre periférica de pacientes con melanoma, podría explicarse como consecuencia de micro metástasis, las cuales según se ha reportado en la literatura ocurren en diferentes estadios de la enfermedad (20). La probabilidad de encontrar células tumorales en circulación es más alta en estadios más avanzados, evento que ha sido reportado por varios autores no solo en melanoma (21) sino también en una gran variedad de tumores sólidos (22, 23). En otro estudio realizado, por el mismo equipo de investigadores del presente trabajo (artículo sometido a publicación), se determinó la expresión del gen MTF en muestras de sangre periférica de pacientes con melanoma, usando la técnica de qRT-PCR, y se halló que un alto porcentaje de pacientes expresaba el gen. No se ha descrito que MTF se exprese en leucocitos, por lo tanto los niveles de expresión pueden deberse a la presencia de células tumorales en las

muestras de sangre periférica tomada a los pacientes con melanoma. De igual modo, la presencia de las anomalías cromosómicas (numéricas y estructurales) y de las fragilidades descritas en el presente estudio pueden provenir de células tumorales presentes en la sangre de pacientes con la enfermedad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permite un acercamiento a la identificación de secuencias inestables dentro de sitios frágiles comunes, candidatas a ser validadas, en estudios posteriores, como marcadores citogenéticos o moleculares, asociados no solo con la progresión de la enfermedad, sino con un mayor riesgo a desarrollarla.

En conclusión los pacientes con melanoma presentaron diversas anomalías cromosómicas que se evidenciaron en el cariotipo realizado por citogenética convencional, a partir de muestras de sangre periférica, no encontradas en el cariotipo de individuos sanos sin ningún tipo de cáncer diagnosticado. Las anomalías identificadas fueron de tipo numérico (monosomía y trisomías del cromosoma X, presencia de cromosoma marcador) y estructural (deleciones 1p y 9q), así como también un gran número de fragilidades cromosómicas (9q11, 9q12). En el grupo control no se observó ninguna anomalía estructural o numérica y el número de fragilidades (22 fragilidades) fue bastante bajo en comparación con el grupo de pacientes con melanoma (233 fragilidades).

Estos hallazgos concuerdan con los reportados por otros estudios, realizados sobre tejido tumoral y podrían constituirse en un indicativo de la presencia de células tumorales en circulación (micrometástasis). Esta información constituye la base para trabajar en la implementación de pruebas de diagnóstico temprano y de orientación tanto del tratamiento, como del pronóstico y seguimiento de la enfermedad.

## REFERENCIAS

1. **Barzilai D, Singer M.** The potential impact on melanoma mortality of reducing rates of suboptimal excision margins. 2003; 120(6):1067-1072.
2. **GLOBOCAN.** Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, in IARC Cancer Base, Lyon, IARC Press. 2002.
3. **Pardo C, Murillo R, Piñeros M, Castro M.** Casos Nuevos de Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología, Colombia, 2002. *Rev Colombiana de Cancerol* 2003; 7(3):4-19.
4. **Limon J.** Melanoma, Cytogenetic Studies. Academic Press 2001; pp 1167-1168.
5. **Wiltshire R, Dennis T, Sondak V, Meltzer P, Trente J.** Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of human cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 131:97-103
6. **Balázs M, Ádám Z, Bégány Á, Takruri A, Ádány R.** Involvement of chromosome losses in the progression and metastasis formation of a human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 109: 114-118.
7. **Dracopoli NC, Bale SJ.** Genetic aspects of cutaneous malignant melanoma. *Semin Oncol* 1988; 15:541-548.
8. **Cowan JM, Halaban R, Francke U.** Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80:1159-1164.
9. **Casorzo L, Luzzi C, Nardacchione A, Picciotto F, Pisacane A, Risio M.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) evaluation of chromosomes 6, 7, 9 and 19 throughout melanocytic tumorigenesis. *Melanoma Res* 2005; 15: 155-160.
10. **Okamoto I, Pirker C, Bilban M, Berger W, Losert D, Marosi C, Haas O, Wolff K, Pehamberger H.** Seven novel stable translocation associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma. *Neoplasia* 2005; 7(4): 303-311.
11. **Mark N, Radmacher M, Simon R, Aickin M, Yang J, Panda L, Emerson J, Roe D, Adair L, Thompson F, Bangert J, Leong S, Taetle R, Salmon S, Trent J.** Chromosome abnormalities in malignant melanoma: clinical significance of non-random chromosome abnormalities in 206 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 122: 101-109.
12. **Brücker E, Magiera H, Herlyn M.** Nerve growth and expression of receptors for nerve growth factor in tumors of melanocyte origin. *J Invest Dermatol* 1991; 96:662-665.
13. **Nagasaki K, Schem C, Von Kaisenberg C, Biallek M, Rosel F, Jonat W, Maass, N.** Leucine-zipper protein, LDOC1, inhibits NF-kappaB activation and sensitizes pancreatic cancer cells to apoptosis. *Int J Cancer* 2003; 105:454-458.
14. **Inoue M, Takahashi K, Niide O, Shibata M, Fukuzawa M, Ra C.** LDOC1, a novel MZF-1-interacting protein, induces apoptosis. *FEBS Lett* 2005; 579: 604-608.
15. **Westbrook A, Schoppee P, Diekman A, Klotz K, Allietta M Hogan K, Slingluff C, Patterson J, Frierson H, Irvin W, Charles J, Coppola F, Herr J.** Genomic organization, incidence and localization of the SPAN-X Family of cancer-testis antigens in melanoma tumors and cell lines. *Clin Cancer Res* 2004; 10:101-112.
16. **Lucas S, De Smet, Karen C, Carrie A, Viars S, Lethá B, Lurquin C, Boon T.** Identification of a new MAGE Gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* 1998; 58:743-752.
17. **Braithwaite A, Royds J, Jackson P.** The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis* 2005; 26 (7): 1161-1169.
18. **Wolfe K, Southern S, Herrington C.** Interphase cytogenetic demonstration of chromosome 9 loss in thick melanomas. *J Cutan Pathol* 1997; 24(7):398-402.
19. **Thompson F, Emerson J, Olson S, Weinstein S, Leavitt A, Leong L, Emerson E, Trent J, Nelson M, Salmon S, Taetle R.** Cytogenetic of 158 patients with regional or disseminates melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83:93-104.
20. **Bastian B, LeBoi P, Hamm H, Brücker E, Pinkel D.** Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998; 58: 2170-2175.

- 
21. **Brossart P.** Hematogenous spread of malignant melanoma cells in different stages of disease. *J Invest Dermatol* 1993; 101(6): 887-889.
  22. **Smith B, Selby P, J Pittman, K Bradley, C Blair.** Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338(8777): 1227-1229.
  23. **Ghossein RA, Bhattacharya S, J Rosai.** Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8): 1950-1960.