

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Programa de Doctorat: MORFOFISIOPATOLOGIA DERMATOLÒGICA

(89/91)

TESI DOCTORAL

***ESTUDI CLINICOPATOLÒGIC I GENÈTIC DEL
MELANOMA MALIGNE I DE LA SÍNDROME
DEL NEVUS DISPLÀSTIC***

Tesi presentada per SUSANA PUIG I SARDÀ per optar al grau
de Doctor en Medicina i Cirurgia

Directors de tesi: Prof. Josep Maria Mascaró i Ballester

Dr. Xavier Estivill i Pallejà

Barcelona, febrer del 2000

Dedico aquesta tesi a
aquelles persones que estimo
i ja no són aquí.

Agraïments

Agraeixo al Dr. Xavier Estivill totes les hores dedicades a aquest projecte, tots els coneixements que d'ell he après i l'ajuda incondicional als meus inicis, així com el fet d'haver-me ensenyat a apassionar-me per la recerca.

Al Professor Josep Maria Mascaró per la co-direcció d'aquesta tesi. Per ser font d'estímul i per tota la seva ajuda.

A la Dra. Teresa Castel, per ser qui va induir-me a iniciar aquest camí, per oferir-me tota la seva ajuda i coneixements, per donar-me suport en els moments difícils, per estimular-me a seguir endavant. Per permetre'm disposar de tots els seus pacients, per la seva col·laboració en el dia a dia.

A L'Anna Ruíz, sense el treball de laboratori de la qual aquesta tesi no seria presentada, per la seva col·laboració, per la seva dedicació, per la seva feina, pel seu ajut.

A La Conxi Làzaro, per haver-me ensenyat des del principi l'ABC del laboratori, pel seu estímul, pel seu dinamisme, pel seu esperit crític, per la seva alegria, per la seva amistat.

Al Graeme Walker, per la seva col·laboració professional, per la informació privilegiada, pels controls enviats, pel seu estímul.

A la Dra. Ruth Halaban, per la seva ajuda, col·laboració i amistat.

Al Juan Antonio Hueto, per tota la seva ajuda incondicional, per haver-me portat de la mà en els meus inicis informàtics, per haver-me dissenyat les primeres bases de dades, per totes les hores invertides, si no perdudes, de la nostra vida.

A tots els co-autors del articles, per la seva col·laboració específica i incondicional per dur a terme els nostres projectes.

A tota la gent del Laboratori de Genètica molecular de l'IRO, per haver-me acceptat entre ells durant anys, per tota la seva col·laboració dia rere dia, estant un metge entre investigadors, em van fer sentir com a casa.

A tot el Servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic, al Dr. Lecha, a tots els companys que l'integren, a tota la infermeria, al Sr. Fermí Calle, a la Maria Eugènia, a la Rosalia, a la Mati i la Magda, cadascú en la seva mesura, en ocasions anònimes, que han fet possible aquest projecte.

A tots els membres de la Unitat de Melanoma per compartir aquest projecte.

Al Dr. Josep Palou, per haver-me ensenyat histopatologia, pel seu esperit crític, per la seva col·laboració, per creure en nosaltres.

Al Dr. Josep Malvehy, per la seva ajuda professional continuada, per la seva feina de camp indispensable per obtenir resultats, pel seu estímulo per seguir endavant, per la seva amistat.

Al Pere Joan i altres col·laboradors del Servei d'Estadística de la Fundació, per creure en el nostre projecte i dedicar-s'hi.

A la Montse Milà, a la Cèlia Barnades, a l'Aurora Sánchez, a la Loli Jiménez i d'altres membres del Laboratori de Genètica Molecular del Clínic amb qui vaig iniciar-me i que encara m'ajuden a diari, per la seva col·laboració, per la seva feina, per la seva entrega.

A la meva família, a la meva mare i la meva germana, als meus fills, als meus amics, pels centenars d'hores robades, per la seva paciència i comprensió.

A tots els pacients que han col·laborat de bon grau en els diversos estudis; sense ells aquest treball no té cap sentit.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ **11**

DEFINICIÓ DE MELANOMA	12
EPIDEMIOLOGIA	13
CARACTERÍSTIQUES CLÍNICO-PATOLÒGIQUES	15
NOUS MÈTODES DIAGNÒSTICS. MICROSCOPIA D'EPILUMINISCÈNCIA	19
EVOLUCIÓ NATURAL DEL MM. PRONÒSTIC	20
ETIOPATOGÈNIA	27

ARTICLE 1 **49**

FINALITAT DEL TREBALL	51
RESUM DEL TREBALL	52
RESULTATS	53

ARTICLE 2 **55**

FINALITAT DEL TREBALL	73
RESUM DEL TREBALL	74
RESULTATS	75

ARTICLE 3 **77**

FINALITAT DEL TREBALL	79
RESUM DEL TREBALL	80
RESULTATS	81

ARTICLE 4 **83**

FINALITAT DEL TREBALL	85
RESUM DEL TREBALL	86
RESULTATS	87

DISCUSSIÓ **89**

Estudi clínic-patològic i genètic del melanoma i de la sd del nevus displàstic

BASES GENÈTIQUES DEL MELANOMA ESPORÀDIC	91
MELANOMA FAMILIAR	98
CONCLUSIONS	105
BIBLIOGRAFIA	109
APÈNDIX	131

Introducció

Introducció

El melanoma (MM) és la neoplàsia cutània més estudiada. Aquest interès prové de diversos factors. Entre ells destacar l'interès social per un càncer, cada cop més freqüent (1-19), que pot afectar a persones de totes les edats, però sobretot a joves (13), clarament relacionat amb l'exposició al sol (nou estil de vida) (20-32), i que en quasi un 20% dels casos és mortal (6,11-12,18-19). L'interès científic pel melanoma inclou aspectes molt variats; des de la resposta immunitària de l'hoste front el tumor fins a les bases genètiques responsables primeres de qualsevol neoformació, passant per l'anàlisi dels factors ambientals desencadenants. La present tesi doctoral va néixer fruit de l'interès per aquest tumor alimentat en la línia d'assistència i recerca que sobre el melanoma existeix a l'HCP i dels profans coneixements científics sobre les bases genètiques de diverses malalties d'un dels seus co-directors.

Aquesta introducció no vol ser un ampli compendi de tots els coneixements actuals sobre el MM sinó que pretén introduir els termes bàsics que més endavant es desenvoluparan en els articles comentats i en les conclusions d'aquesta tesi.

Definició de melanoma

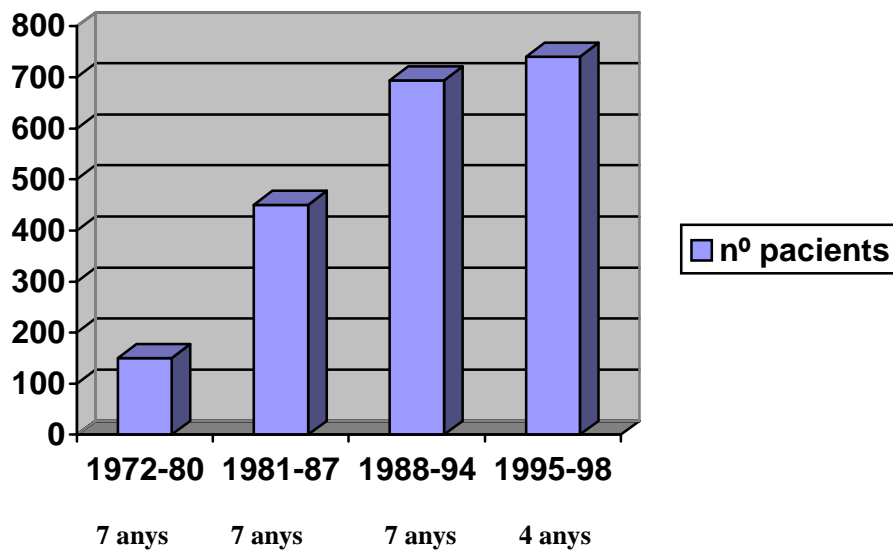
El melanoma és la neoplàsia maligna originada en els melanòcits. Els melanòcits són unes cèl·lules dendrítiques d'origen neuroectodèrmic que es troben ubicades a nivell cutani entre els queratinòcits bassals epidèrmics i el fol·licle pilós. La principal funció del melanòcit és la producció de pigment melànic i la seva distribució entre els queratinòcits. Cada melanòcit subministra melanina a 36 queratinòcits constituint una unitat melànica epidèrmica. Però també es troben melanòcits en d'altres localitzacions com a la coroides, nervis perifèrics, cadena simpàtica, oïda interna, leptomeninges, etc. La melanina es troba empaquetada en melanosomes que es col·loquen per damunt dels nuclis dels queratinòcits protegint-los dels efectes carcinogènics de la llum ultraviolada, protegint també de la radiació ultraviolada les capes inferiors de la pell.



Epidemiologia

Incidència

L'augment en la incidència de melanoma en la raça caucàsica només és comparable en l'augment que presenta la incidència de carcinoma bronquial en dones fumadores (1-2). No existeix un registre prou fiable a Catalunya però, el nombre de malalts atesos al Servei de Dermatologia de l'HCP per MM s'ha triplicat en els darrers 14 anys.



El risc actual de patir un MM als Estats Units és de 1 cada 76 persones (1 de cada 70 de raça blanca) front a 1 de cada 1500 que era el risc a l'any 1930 (12). L'any 1993 el risc de patir un MM abans del 75 anys a Austràlia era de 1 per cada 27 homes i 1 de cada 36 dones (11). Gràcies a les mesures de fotoprotecció i formació sanitària de tota la població, la incidència de melanoma en dones australianes comença a disminuir. El melanoma és molt més freqüent en persones caucàsiques (33-34) de fototipus clars (35-36) molt exposades a la radiació solar (37) (habitants de zones tropicals i d'origen nord-europeu), però també té una incidència preocupant en d'altres països com el nostre on el clima permet unes exposicions a la llum solar extremadament altes.

Mortalitat

La mortalitat global per MM als Estats Units ha seguit augmentant un 2% anual des del 1950 (6). De fet la supervivència a 5 anys ha millorat molt en el melanoma localitzat (estadi I) del 50% als anys 50, a més del 80% en l'actualitat (12), però l'augment en la incidència fa que cada any morin més persones per MM (18-19). D'altra banda la mortalitat dels casos metastàtics es mantenia constant, aconseguint-se només una discreta millora en el temps lliure de malaltia. Actualment, utilitzant les terapèutiques més innovadores, combinant quimioteràpics (DTIC, Cisplatí i Vinblastina) amb immunomoduladors (Interferó alfa i Interleukina-2), s'han aconseguit respostes de fins a un 60%, que poden perdurar mesos o anys en un 10% dels casos (38-39).

Característiques clínicopatològiques

Característiques clíniques

Les característiques clíniques del MM queden definides en gran mesura per la normativa ABCD, és a dir, cal sospitar un MM davant una lesió cutània pigmentada asimètrica, de vores (border en anglès) irregulars, amb presència de diversos colors (policròmica) o negra i que té un canvi perceptible en el seu diàmetre. El símptoma més freqüent és la pruija, però les lesions també poden resultar doloroses. D'altres signes que poden estar presents són la ulceració i el sagnat.



Classificació clinicopatològica

Encara que diversos autors prefereixen considerar tots els MM com una sola entitat, es classifica el melanoma en diversos subtipus (40-41).

1. Melanomes que s'originen als melanòcits de la unió dermoepidèrmica:
 - 1.1. Amb fase de creixement superficial
 - 1.1.1. MM d'extensió superficial (SSMM),
 - 1.1.2. MM lentiginosos
 - 1.1.2.1. MM lentiginós acral (ALM)
 - 1.1.2.2. Lèntig maligne melanoma (LMM)
 - 1.1.2.3. MM lentiginós de mucoses
 - 1.1.3. MM no classificable
 - 1.2. Sense fase de creixement en superfície
 - 1.2.1. MM nodular (NM)
2. Melanomes que no s'originen en melanòcits de la unió dermoepidèrmica
 - 2.1. D'origen dèrmic
 - 2.1.1. Sobre nevus congènit
 - 2.1.2. Sobre nevus blau
 - 2.2. Melanoma desmoplàstic
 - 2.3. Melanoma de parts toves
 - 2.4. Melanomes no classificables

Els melanomes que s'originen als melanòcits de la unió dermoepidèrmica són en molt els més freqüents. Els primers subtipus de melanomes d'origen epidèrmic es caracteritzen per tenir una primera fase de creixement horitzontal, envaint la unió dermoepidèrmica, però sense travessar la membrana basal. Posteriorment presenten una segona fase de creixement vertical en la qual envaeixen dermis papil·lar, després dermis reticular i fins i tot arribant al teixit cel·lular subcutani. El NM, en canvi, té un creixement vertical des de l'inici. Quan els melanomes amb fase de creixement

horitzontal envaeixen dermis ho fan de la mateixa manera que els melanomes nodulars. En la raça caucàsica el més freqüent és el SSMM (70%), seguit del NM (15-30% dels casos, segons les sèries); LMM (4-10%) i del ALM (2-8%).

La majoria dels melanomes s'originen en la unió dermoepidèrmica però hi ha casos descrits de melanomes originats en melanòcits dèrmics (normalment es tracta de nevus congènits malignitzats, però també melanomes sobre nevus blaus o melanomes d'origen dèrmic com el melanoma desmoplàstic) (42-43). En aquests darrers casos no es poden considerar els subtipus anteriors. A l'igual que en els melanomes de coroides o primaris d'òrgans interns.

Precursors de melanoma

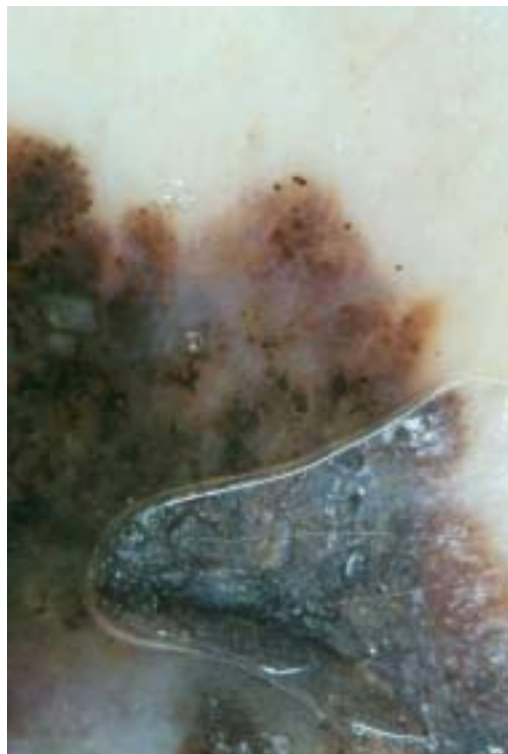
El MM pot originar-se en els melanòcits de pell sana (melanoma *d'emblée*) però també en melanòcits de pell prèviament danyada per la llum UV (p.e. melanoma en malalts afectes de xeroderma pigmentosum (23) o el LMM que apareix en pell molt fotoexposada sobre la lesió premaligna coneguda com a melanosi precancerosa de Dubreüilh) (41). Però el MM pot originar-se també en el sí de lesions preexistents (nevus melanocítics). Quins són els nevus que poden malignitzar? De fet hi ha descrits, a la literatura internacional, melanomes que han aparegut sobre tots els tipus de nevus coneguts, però és cert que el risc no és per tots igual. El risc més elevat és el dels nevus congènits gegants on la incidència de MM al llarg de la vida pot arribar al 18-28% en algunes sèries, però en d'altres, aquest risc no supera el 4% (42-43). D'altra banda, el melanoma pot aparèixer també en nevus congènits petits donat que en un 19% dels melanomes poden identificar-se aquestes lesions subjacents. De fet, els nevus melanocítics no són tan sols lesions precursoras sinó que el nombre de nevus és també un marcador de risc (44-48). Un altre grup de nevus associat a un risc augmentat de transformació maligna és el nevus displàstic o atípic (49-56). Aquesta lesió va ser descrita a l'any 1978 en el context d'unes famílies que presentaven una alta incidència de melanoma associada a la presència d'un nombre elevat de nevus adquirits de característiques peculiars. Aquests nevus eren d'un diàmetre superior al centímetre, de tons rosats, vores mal definides i tenien una forma maculosa amb una pàpula central (ou ferrat). Posteriorment s'ha treballat molt intentant definir millor les característiques clíniques i histològiques d'aquest tipus de nevus creant-se una gran controvèrsia al respecte. Hi ha autors que desconfien de la utilitat d'identificar aquestes lesions, i hi ha d'altres que senzillament no hi creuen. Fruit d'aquesta controvèrsia va sorgir la idea d'anomenar-los nevus atípics en lloc de nevus displàstics (terme maleït en part per la utilització que en varen fer les companyies d'assegurances americanes). De tota manera, cada cop són més les evidències que els nevus atípics o displàstics no són sols un marcador de malalts amb més risc de patir melanoma sinó també precursors del mateix.

Nous mètodes diagnòstics. Microscòpia d'epiluminiscència

Donat que el diagnòstic clínic de melanoma no resulta fàcil, i per tal de diagnosticar les lesions en la fase més inicial, s'ha desenvolupat una tècnica d'imatge per augmentar la sensibilitat i especificitat en el diagnòstic clínic del melanoma (57-62). Aquesta tècnica és la microscòpia d'epiluminiscència.

Microscòpia d'epiluminiscència (EPL)

Aquesta és una tècnica fonamental en el diagnòstic de lesions cutànies pigmentades. La seva utilitat ha quedat palesa, perquè augmenta la sensibilitat en el diagnòstic del MM fins a més del 90% quan la utilitza personal expert en front al 70% de sensibilitat dels dermatòlegs experts que no la utilitzen. L'aparell és un microscopi de superfície que té una lent de 6X a 40X augments. Utilitzant oli d'immersió i/o llum polaritzada aquesta tècnica permet la valoració d'una sèrie de paràmetres que s'escapen a l'exploració ocular convencional. L'aplicació de tècniques de digitalització d'imatge permet enregistrar les dades procedents d'aquesta exploració i facilita en gran mesura la detecció precoç del melanoma en persones de risc.



Evolució natural del MM. Pronòstic

L'agressivitat del melanoma no ve en general donada per la seva capacitat d'invasió local, ben al contrari, és la seva gran capacitat de metastatització a distància la que finalment compromet la vida del malalt en la majoria dels casos (63). En d'altres és la persistent recidiva regional, fins i tot després de 10 anys del tractament del tumor primari, la que compromet l'extremitat afecta i fins i tot al propi individu. Quins seran, doncs els melanomes que donaran metàstasi? Respondre aquesta qüestió és realment important no sols per poder informar dels riscos al malalt i a la seva família sinó també per prendre decisions terapèutiques. Donat que la curació del MM en estadi IV (metastàtic disseminat) és molt baixa, cal tractar el més eficientment possible els melanomes de risc quan encara no hi ha evidència clínica de metàstasi. Per altra banda cal evitar la morbiditat i el cost dels tractaments aplicats en aquells casos en què no sigui necessari. L'única manera de seleccionar correctament els malalts a tractar seria coneixent millor el comportament del melanoma en cada cas, és a dir, disposant de nous factors pronòstics que ens permetessin predir el risc de metàstasi d'un tumor primari amb una alta sensibilitat i especificitat.

Factors pronòstics clínics

Estadiatge (64-71). El principal factor pronòstic del melanoma en el moment del diagnòstic és el seu estadi clínic. És a dir, el fet que la malaltia s'hagi disseminat o no. En els estadis I i II on la malaltia només té una invasió local la supervivència és superior al 80% als 5 anys. Quan hi ha malaltia regional (ganglis limfàtics regionals afectats) o estadi III la supervivència als 5 anys és del 36%, i en la malaltia disseminada (estadi IV) la malaltia és incurable amb una supervivència mitjana de 6 mesos.

Localització (72-78). La localització del tumor per si mateixa té valor pronòstic independentment del gruix del tumor. Així doncs les lesions a cuir cabellut, mans i peus tenen pitjor pronòstic. Es coneixen unes localitzacions anomenades BANS (back, arm, neck, scalp) que es consideren de pitjor pronòstic en melanomes primis. Quan el tumor és més gruixut, hi ha més localitzacions de mal pronòstic.

Edat i sexe (79-80). L'edat avançada és un factor de mal pronòstic i en general les dones sobreviuen més que els homes. De tota manera el pronòstic en dones i homes s'igualava després de la menopausa. El MM és més freqüent en les dones encara que l'augment d'incidència és més espectacular en els homes.

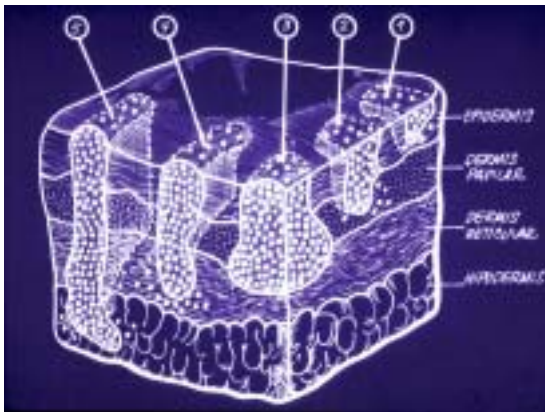
Subtipus tumoral (75-76,81). La supervivència dels melanomes estadi I varia depenent del subtipus clínic. Els subtipus nodular, MM amelanòtic (sense producció de pigment), el ALM, i el MM inclassificable tenen pitjor pronòstic.

Recidiva tumoral (82). La recidiva local del tumor suposa un empitjorament del pronòstic reduint-se la supervivència als 5 anys al 75%. Sol tenir lloc els 5 primers anys després del diagnòstic però de vegades pot donar-se fins i tot 10 anys més tard.

Factors pronòstics histològics

Nivell d'invasió de Clark (83). Un cop iniciada la fase de creixement vertical a qualsevol tipus de melanoma, aquest té un comportament similar d'invasió de la dermis. Clark ho va classificar de la següent manera, obtenint un paràmetre de valor pronòstic:

- I Envaeix l'epidermis sense travessar la membrana basal
- II Sobrepassa la membrana basal envaint parcialment la dermis papil·lar
- III Envaeix tota la dermis papil·lar i contacte amb la reticular no envaint-la
- IV Envaeix la dermis reticular
- V Envaeix el teixit cel·lular subcutani

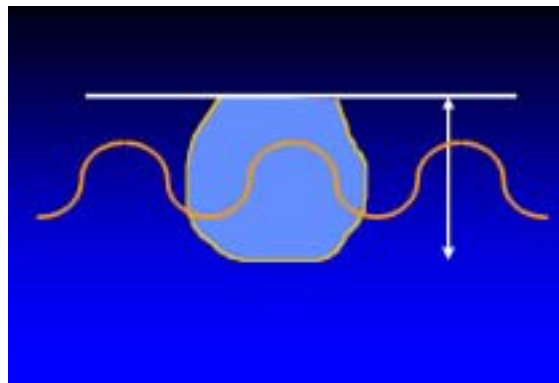


Supervivència 5 anys / 8 anys

I	
II	97% / 96%
III	90% / 76%
IV	79% / 61%
V	58% / 39%

El nivell d'invasió de Clark té especial interès en els melanomes primis (Breslow < 0.76) (84).

Grau de profunditat de Breslow (85). Es tracta de la mesura en mm del gruix del tumor mesurat de manera perpendicular a la superfície cutània, des de la capa granulosa fins la zona més profunda del tumor. És una mesura més objectiva. Diversos treballs han trobat punts de tall natural en la mesura contínua del Breslow. Així es poden classificar els tumors en prims (<0,76 mm), de gruix entremig (0,76-1,49 mm) de gruix moderat (1,50-2,99 mm i 3-4,99) i molt gruixuts (> 5 mm). Aquests diversos grups correlacionen amb un molt diferent pronòstic.



	Supervivència 5 anys
< 0,76	98%
0,76-1,49	90%
1,50-2,99	83%
3,00-4,99	66%
>5	57%

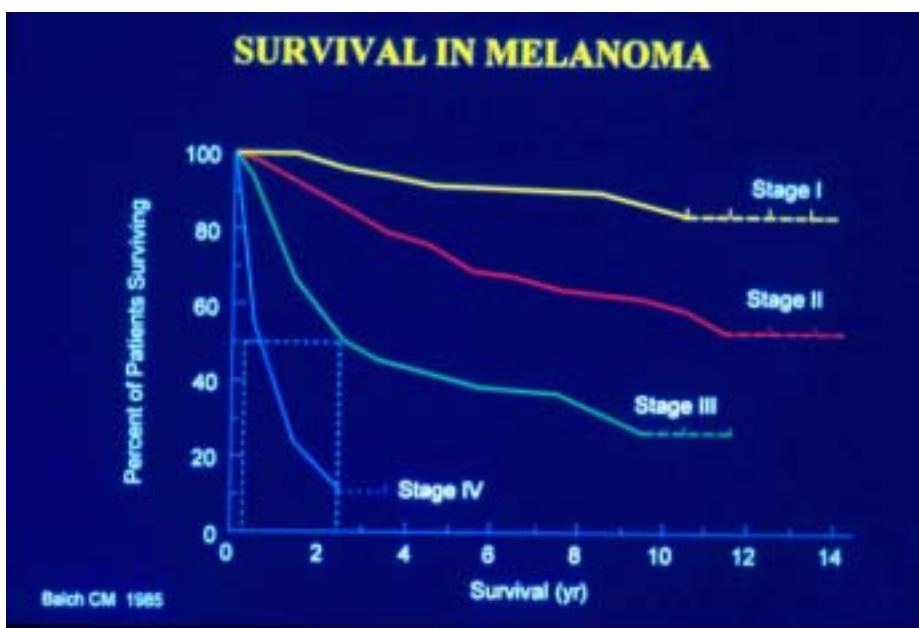
Risc de Bagley (86). Utilitzant conjuntament la classificació de Clark i Breslow, Bagley va agrupar els melanomes en categories de risc:

Baix risc:	B < 0.76	i	C II, III
Risc mitjà:	B < 0.76	i	C IV
	B 0.76-1.5		qualsevol Clark
	B > 1.5	i	C III
Alt risc:	B > 1.5	i	C IV-V

Estadiatge (69-71). Donat que l'estadiatge fruit de la unió de criteris de la AJCC (American Joint Committee on Cancer), i de la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) al 1988 va ser el TNM anatomopatològic (pTNM), incloc l'estadiatge en aquest apartat.

Estadiatge segons AJCC/UICC pTNM 1988

- IA Melanoma primari. Breslow <0.75 o nivell de Clark II (pT1)
No metàstasi ganglionar ni sistèmiques (N0M0)
- IB Melanoma primari. Breslow 0.75-1.50 o nivell de Clark III (pT2)
No metàstasi ganglionar ni sistèmiques (N0M0)
- IIA Melanoma primari. Breslow 1.51-4.00 o nivell de Clark IV (pT3)
No metàstasi ganglionar ni sistèmiques (N0M0)
- IIB Melanoma primari. Breslow >4.00 o nivell de Clark V (pT4)
No metàstasi ganglionar ni sistèmiques (N0M0)
- III Metàstasi a ganglis limfàtics regionals o en trànsit (pTxN1-2M1)
- IV Metàstasi sistèmiques (pTxNxM1)



D'altres. Hi ha d'altres factors pronòstics histològics que poden ajudar a conèixer una mica millor la possible evolució del tumor així com la ulceració histològica del tumor (80), la presència de cèl·lules plasmàtiques a l'infiltrat (87), l'índex mitòtic (80,88-90), la resposta limfocitària (75), la vascularització tumoral (91), el volum nuclear (92), el tipus d'invasió en profunditat (84) o la presència de regressió (80,92-95).

Factors pronòstics biològics

Complexa Major d'histocompatibilitat (96). La pèrdua d'expressió dels antígens HLA de classe I comporta una pèrdua d'efectivitat de les cèl·lules citotòxiques en front del tumor: Si a l'hora el tumor manté l'expressió d'algunes molècules de classe II, el tumor escapa de la citotoxicitat de les cèl·lules NK.

Citocines (97,98). La detecció de diverses interleucines IL-7, IL-8, IL-1 i de factor de necrosi tumoral TNF, són un factor de bon pronòstic donat que representen una resposta de l'hoste davant el tumor.

Integrines (99). L'estimulació de la neovascularització i la capacitat de les cèl·lules del tumor per adherir-se a la membrana basal de l'endoteli vascular mitjançant molècules d'adhesió té una gran transcendència. Així doncs, la detecció de receptors d'integrines expressats pel tumor comporta una més gran capacitat de progressió tissular i per tant un pitjor pronòstic.

Subpoblacions limfocitàries (100). La detecció de limfòcits citotòxics en el tumor primitiu indica un millor pronòstic.

Citometria de flux (101). L'aneuploidia determinada en el teixit tumoral és un paràmetre pronòstic en estudi.

Detecció de cèl·lules circulants (102). La detecció de cèl·lules circulants mitjançant rtPCR de la tirosinasa (i també d'altres antígens específics dels melanòcits) permet identificar subpoblacions de pacients amb més risc de desenvolupar metàstasi independentment de les característiques del tumor primari i de la resta de factors pronòstics clàssics.

Quantificació de marcadors sèrics (proteïna s100 i MIA) (103-104). L'augment del nivell sèric d'aquestes proteïnes permet identificar recaigudes uns mesos abans que les metàstasis puguin ser identificades amb els mitjans diagnòstics habituals.

Etiopatogènia

El melanoma una malaltia genètica

Cal considerar el melanoma com a una malaltia genètica (105). Aquest caràcter ve donat pel seu inici en una primera cèl·lula (monoclona) que és capaç de transmetre a les seves cèl·lules filles uns avantatges de creixement, supervivència i invasió que les fa progressar fins a comprometre la integritat de l'individu. D'altra banda, l'origen d'aquest fenotip ve donat per canvis en el genoma produïts per diversos factors ara coneguts com a carcinògens i modificat i perpetuat per les mitosis successives. En aquestes mitosis successives es van produint modificacions en el genoma que donen variants en el si d'un mateix tumor (mosaic), de manera que les variants més ben dotades, amb més capacitat infiltrativa, que escapen millor de la immunitat de l'hoste, sobreviuen sent les responsables de la progressió clínica de la malaltia. Finalment, cal dir que existeixen diversos gens responsables de una certa susceptibilitat a patir melanoma, constituint la síndrome del melanoma familiar.

Carcinogènesi

La radiació ultraviolada (u.v.) solar té un paper fonamental en el desenvolupament del melanoma (106). Hi ha moltes evidències epidemiològiques que associen el melanoma amb l'exposició a aquest tipus de radiació (107-112). S'ha demostrat un increment en la incidència de melanoma en les persones d'origen nòrdic desplaçades a zones tropicals (112), així com en aquelles persones que reconeixen haver patit cremades solars de segon grau els primers 15 anys de la vida. La incidència de melanoma és més alta en les persones de fototipus clars que es cremen amb la radiació solar amb més facilitat (113-114) i alhora el melanoma és molt menys freqüent en les races pigmentades (115-116). Recentment s'ha evidenciat un augment en la incidència de melanoma en malalts afectes de psoriasi tractats amb PUVA i en persones que per motius d'estètica utilitzaven els llits solars d'UVA. Així doncs l'augment progressiu en la incidència del melanoma pot tenir molt a veure amb els canvis en l'estil de vida d'aquesta segona meitat de segle, on la pràctica d'esports a l'aire lliure i la moda del bronzejat han condicionat molt la conducta de la societat (112-114). D'altra banda la disminució de la capa d'ozó pot ser també un factor important a tenir en compte. Així doncs, en els països on més seriosament s'han dut a terme les campanyes de fotoprotecció en la població general i prevenció de melanoma, comencen a obtenir-se resultats amb una desacceleració en la corba d'augment d'incidència del melanoma.

De tota manera, la relació entre la radiació ultraviolada i el melanoma té un caràcter complex. El melanoma no és més freqüent a les zones del cos més fotoexposades com la cara si no que apareix amb freqüència a zones tapades com el tronc. Així hi ha diverses evidències que relacionen el melanoma amb exposicions al sol intenses i discontinues (en països del nord d'Europa) (106). Un treball realitzat a Granada (26) demostra, pel contrari, que a la població que ells varen recollir, el melanoma era més freqüent en persones exposades al sol de manera continuada (agricultors,..). De fet l'únic tipus clínic de melanoma que apareix amb pell clarament elastòtica i fotoenvellida és el LMM sobre melanosí precancerosa de Dubreuilh, que de fet és un tipus de melanoma de molt

llarga evolució i pronòstic més lleu. Estudis moleculars permeten evidenciar una especial resistència dels melanòcits a l'apoptosi induïda per la radiació U.V. Aquesta resistència pot ser important per mantenir la integritat d'aquesta cèl·lula per permetre el bronzejat i la posterior protecció de tota la pell a exposicions successives, però d'altra banda pot afavorir que melanòcits amb el seu DNA danyat sobrevisquin i acumulin noves mutacions fins a produir un fenotipus neoplàstic (106).

Recentment s'han descrit en melanomes algunes mutacions en el gen *CDKN2A*, del que en parlarem més endavant, induïdes per la llum ultraviolada reforçant un cop més la importància d'aquesta radiació en l'etiopatogènia del melanoma (117-118).

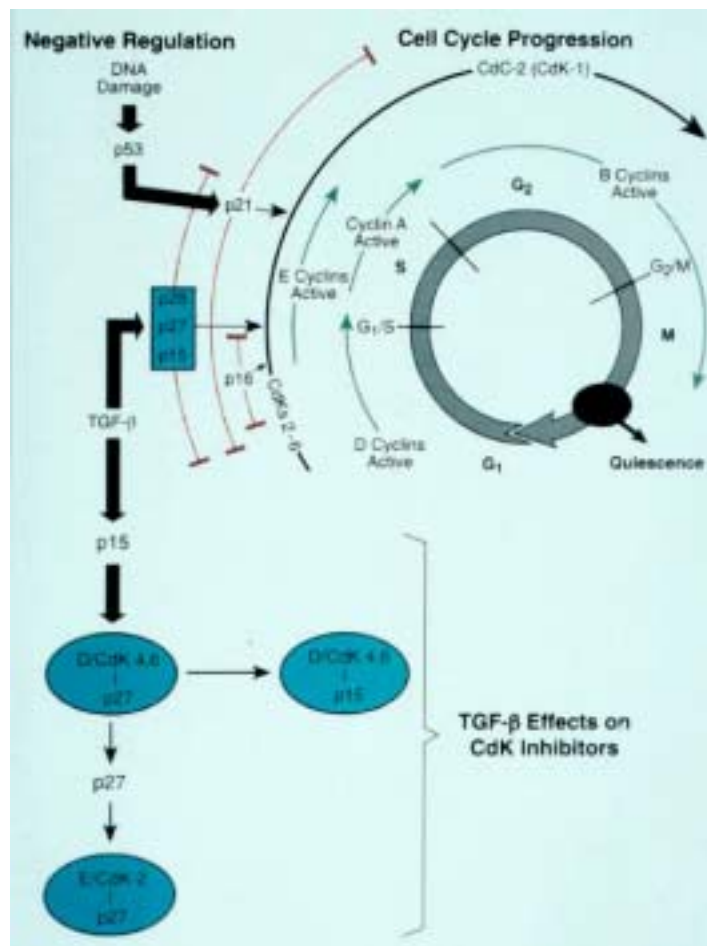
Oncogens i gens supressors de tumors (119)

Els gens que primer varen ser descrits relacionats amb l'etiopatogènia del càncer són els coneguts com a oncogens. Aquests gens són presents en una forma inactiva (proto-oncogen) o poc expressada en totes les cèl·lules normals de l'organisme. Homòlegs d'aquests gens són també presents en el genoma de diversos virus que havien estat relacionats amb neoplàsies. Quan aquests pro-oncogens són activats o sobreexpressats per una mutació afavorida p.e. per la infecció amb un virus, la cèl·lula pateix una transformació que la conduirà al fenotip neoplàstic. Si aquest canvi es reverteix la cèl·lula pot tornar a adquirir un fenotip de normalitat. Són centenars els oncogens coneguts. D'entre ells les famílies dels *Ras*, *Myc*, *Fos*, etc. Cap d'ells sembla tenir un paper important en la gènesi del melanoma encara que segurament són importants en fases més tardanes de l'evolució. De fet sembla que un 10% dels melanomes metastàtics tenen mutacions a *Ras* (120). Darrerament en un treball experimental es demostra una gran susceptibilitat a desenvolupar melanomes en ratolins transgènics que no tenen *CDKN2A* i expressen *H-ras^{g12v}* activat de manera selectiva als melanòcits (121).

Posteriorment es varen identificar diversos gens que tenien un efecte protector davant de les neoplàsies. Inicialment se'ls va anomenar antioncogens però actualment s'utilitza el terme de gens supressors de tumors. Es tracta de gens que solen tenir una funció important en la homeostasi cel·lular i que cal que es danyin les dues còpies que tota cèl·lula disposa (una d'origen matern i una altra d'origen patern) perquè acabi desenvolupant-se una neoplàsia. No arriba a la trentena els gens supressors de tumors descrits, però el cert és que tenen una influència molt gran en el desenvolupament dels càncers humans. El *p53* és el gen supressor de tumors més conegut, implicat en almenys el 50% de les neoplàsies humanes, però que no té un paper important en el desenvolupament de melanoma (122). Altres gens supressors de tumors són els gens de la neurofibromatosi 1 i 2 (NF1 i NF2), el gen del retinoblastoma (Rb), el gen de la poliposi coli (APC), etc.

Cicle cel·lular i melanoma (123)

L'any 1994, mentre el primer article d'aquesta tesi era sotmès per valoració, va ser descrit el gen més important, fins al moment, en la gènesi del melanoma (124-129). Es tracta del gen *CDKN2A* que codifica per la proteïna p16. Aquesta proteïna té una funció important en la regulació del cicle cel·lular. Actua inhibint la kinasa 4 depenent de les ciclines (CDK4). D'aquesta manera frena la progressió del cicle cel·lular. De fet, molts dels oncogenes i gens supressors de tumors coneguts actuen a nivell de la regulació del cicle cel·lular (123).



Un dels punts crucials en la progressió del cicle cel·lular és la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma (Rb) que allibera factors transcripcionals i permet l'avançament en el cicle cel·lular. Mutacions en el gen Rb afavoreixen el desenvolupament de neoplàsies ja que actua com a gen supressor de tumors (123). Per a què la proteïna Rb es fosforili cal que actuïn diverses quinases (CDK4, CDK6) que alhora són regulades mitjançant una sèrie de proteïnes inhibidores. p53 és una de les principals proteïnes inhibidores, a més d'actuar a d'altres nivells com en la inducció d'apoptosi. Així doncs la majoria de proteïnes inhibidores del cicle cel·lular poden actuar com a gens supressors de tumors (p15, p16, p18, p19, p21, p53,...), i en canvi la implicació de les quinases en carcinogènesi seria actuant com a oncogens (130).

Melanoma i la regió cromosòmica 9p21 (CDKN2A, CDKN2B i p19ARF-p14)

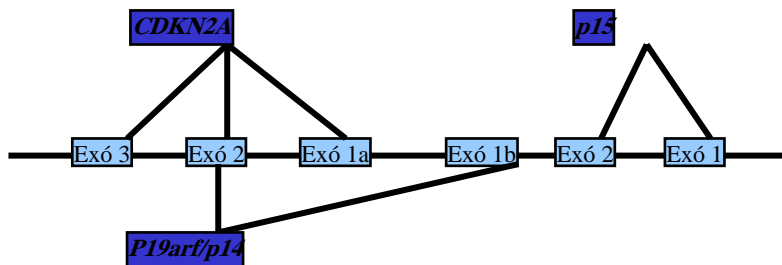
La regió cromosòmica 9p21 ja s'havia descrit implicada en melanoma a tres nivells:

- Citogenètica:
 - Translocació afectant aquesta zona en una pacient afectat de 7 melanomes primaris i un neurofibroma plexiforme (131).
 - Aberracions cromosòmiques presents en cariotips tumorals (132-135).
- Delecions presents en DNA tumoral o de línies cel·lulars (136-139):
 - L'anàlisi de marcadors polimòrfics havia permès identificar pèrdues d'heterozigositat freqüents i presència de delecions homozigotes d'aquesta regió cromosòmica en línies cel·lulars de melanoma.
- Anàlisi de lligament (140):
 - L'estudi de famílies amb FAMMM havia identificat un possible locus a 9p21(141-143).

CDKN2A es troba ubicat en el braç curt del cromosoma 9, a la regió 9p21. *CDKN2A* està constituït per tres exons codificants: l'exó 1 alfa de 125 parells de bases, l'exó 2 de 307 parells de bases i l'exó 3 de 12 pb (144).

En aquesta mateixa regió s'han descrit dos altres gens que també codifiquen per proteïnes inhibidores del cicle cel·lular. Es tracta per una banda del gen *CDKN2B* que codifica per la proteïna p15 (145). *CDKN2B* i *CDKN2A* estan ubicats en tàndem a 9p21. Per l'altra, d'una proteïna que prové dels mateixos exons 2 i 3 de *CDKN2A*, però amb una pauta de lectura diferent que s'origina en un exó 1 diferent (exó 1beta). *P19ARF* (p14 en humans) s'origina en l'exó 1 beta que es troba ubicat entre *CDKN2B* i l'exó 1 alfa de *CDKN2A* i comparteix els exons 2 i 3 amb aquest darrer gen (146-149).

Al gen *CDKN2A* inicialment se li va donar el nom de *MTS1* (múltiple tumor supressor gene 1), doncs es va veure que línies cel·lulars de tumors de diversos orígens presentaven delecions homozigotes d'aquest gen, i en un percentatge menor, mutacions puntuals (125-127). Posteriorment es va veure que el percentatge de delecions i mutacions era molt menor quan s'estudiaven els tumors en lloc de les línies cel·lulars (150-168). Fins el moment no s'han descrit mutacions puntuals en tumors en els altres dos gens encara que hi ha un cas de melanoma esporàdic amb una mutació somàtica que consisteix en una delecio homozigota afectant *CDKN2B* i no *CDKN2A* (169).



A la zona intrònica 5' de l'exó 1 alfa de *CDKN2A* hi ha una regió de les anomenades illes CpG. Aquestes illes CpG poden metilar-se i quan estan metilades impedeixen la transcripció gènica i per tant l'expressió del producte proteic. Aquest mecanisme de metilació permet a les cèl·lules expressar o no diferents proteïnes depenent del moment de l'evolució. Així doncs hi ha proteïnes que s'expressen durant l'embriogènesi i posteriorment queden metilades i deixen d'expressar-se. La metilació de l'illa CpG de *CDKN2A* ha estat identificada en algunes línies cel·lulars tumorals apuntant a la metilació com a possible mecanisme inhibidor de l'expressió de p16 i responsable de la carcinogènesi en alguns melanomes esporàdics (170-171). Per últim, existeixen mecanismes postranscripcionals que regulen l'expressió de p16 (172) i que són responsables de la carència d'aquesta proteïna en presència de RNA missatger de *CDKN2A*.

“Knock out” per CDKN2A i p19ARF

S’han produït al laboratori ratolins que en el seu genoma no tenen cap al·lel funcionant d’aquests gens i que per tant selectivament no expressen alguna d’aquestes proteïnes (173-174). Els ratolins que no expressen p16-p19ARF, com els ratolins que no expressen selectivament p19arf, no desenvolupen melanomes, però si d’altres tipus de tumors, sobre tot limfomes i sarcomes. Són ratolins altament sensibles a carcinògens. Els ratolins heterozigots en cap cas han desenvolupat neoplàsies espontàniament.

Hi ha descrits dos pacients homozigots per mutacions al gen *CDKN2A* i que per tant no tenen una proteïna p16 funcionant a cap de les seves cèl·lules (175). Aquests pacients podrien considerar-se knock-out humans. Un dels dos pacients va desenvolupar un melanoma, però l’altre va morir a la cinquena dècada de la vida a conseqüència d’una neoplàsia gàstrica però sense haver desenvolupat un melanoma. Així doncs, podem dir que l’absència de p16 funcional en humans no és letal i facilita el desenvolupament de melanomes, però no és suficient per si mateixa de produir-los. Caldria d’altres alteracions posteriors.

Susceptibilitat a patir melanoma. Melanoma familiar

D'un 8 a un 12% dels casos de melanoma tenen lloc en un àmbit familiar (176-179). Les famílies amb diversos casos de melanoma tenen sovint un fenotip especial i alhora unes característiques comunes. Fenotípicament els individus d'aquestes famílies poden presentar múltiples nevus atípics o displàstics conformant la síndrome del nevus displàstic familiar o bé la síndrome FAMMM (Familial Atypical Mole-Malignant Melanoma syndrome). Però també hi ha casos de melanoma familiar no associat a la presència de nevus atípics o displàstics. De fet, quan es considera el melanoma com a fenotip afecte en els estudis de lligament, aquests indiquen la regió cromosòmica 9p21 en un percentatge important de famílies (141-143). Si es considera com a fenotip afecte la presència de nevus atípics o displàstics associats o no a la presència de melanoma el lligament es focalitza en una regió del braç curt del cromosoma 1 (1p36) (180-182). Diversos autors identifiquen heterogeneïtat genètica en el melanoma familiar (182-185). Així doncs tenim diversos tipus de melanoma familiar: 1) famílies amb pacients amb melanoma no associats a nevus; 2) famílies amb pacients amb melanoma i nevus displàstics o atípics amb d'altres membres de la família que tenen nevus displàstics o atípics però no melanoma. En els casos familiars de melanoma s'ha identificat una edat menor en el diagnòstic del melanoma, una més alta incidència de pacients amb melanomes múltiples, un relatiu millor pronòstic associat a un diagnòstic de lesions de menys risc (Clark i Breslow inferiors) donat possiblement a un diagnòstic precoç, i, una alta incidència d'altres neoplàsies com càncer de colon o de pàncrees. De fet, d'un 18 a un 50% de les famílies amb melanoma familiar són portadores de mutacions a *CDKN2A* associades a la malaltia (186-193). Els estudis funcionals realitzats amb algunes de les proteïnes mutants han mostrat que la p16 mutada perd habilitat per unir-se al seu lligant, la proteïna CDK4. D'aquesta manera queda reduïda la seva funció inhibidora del cicle cel·lular (189,194-195). La majoria de les mutacions identificades a *CDKN2A* afecten residus aminoàcids d'alguna de les quatre regions "ankyrin repeats". Aquestes regions tenen un paper important en la unió de p16 als seus lligants

CDK4/6, i de fet els estudis funcionals realitzats en proteïnes portadores de mutacions en les regions “ankyrin repeats” mostren defectes funcionals més severes. Recentment s’ha identificat una mutació puntual en un nucleòtid de la regió no codificant de *CDKN2A*, corresponent al seu promotor, associada a melanoma familiar (196). Així doncs, pot augmentar el percentatge de famílies de melanoma amb lligament a 9p21 de les quals s’identifiqui la mutació responsable del fenotip mitjançant la identificació de mutacions en zones no codificants de *CDKN2A*. La importància del complex p16/CDK4 en la patogènesi del melanoma ha quedat palesa en identificar-se mutacions germinals en 4 famílies de melanoma a l’exó 2 de CDK4, afectant el domini de la proteïna pel qual s’uneix a p16 i fent que la proteïna CDK4 mutada sigui resistent a la inhibició de p16 (190,193,197-198).

Els pacients que presenten més d’un melanoma primari han de ser considerats també com a pacients amb susceptibilitat a la malaltia i poden ser els casos índex de famílies que no havien expressat aquesta susceptibilitat o que probablement havia passat desapercibuda. De fet s’han identificat mutacions germinals en pacients amb melanoma múltiple sense antecedents familiars coneguts en àdhuc d’un 15% dels casos estudiats (199).

S’han descrit diverses famílies on una mutació a *CDKN2A* es troba associada no només a melanoma si no també a adenocarcinoma de pàncrees indicant el possible efecte carcinogènic de les mutacions germinals de *CDKN2A* a d’altres teixits (200-202). De fet, ja era coneguda l’associació d’altres neoplàsies en l’àmbit del melanoma familiar (203-205).

Conceptualment, mutacions germinals afectant els gens de les proteïnes p15 i p14 podrien estar també implicats en el melanoma familiar en major o menor grau, però fins al moment, no s’ha identificat cap pacient portador de mutacions a *CDKN2B* ni a l’exó 1beta de *p19ARF-p14*. En dues famílies australianes, afectades de melanoma, s’ha identificat una alteració en l’expressió de p14 vers l’expressió de p16 en línies cel·lulars limfoblastoides (206). Aquesta alteració era present als individus afectes presentant una disminució en l’expressió de p19 respecte a l’expressió de p16 en absència de mutacions en les regions codificants d’ambdues

proteïnes. Aquest, doncs, podria ser un altre mecanisme hereditari de susceptibilitat a patir melanoma lligat a 9p i en absència de mutacions a les zones codificants dels gens ubicats en aquesta regió cromosòmica.

Hi ha identificat un tercer gen relacionat amb el melanoma familiar. És el gen que codifica pel receptor 1 de la melanocortina (MC1R) (207). La melanocortina (MSH) és una hormona d'origen hipofisari que regula la resposta cutània a la radiació U.V. i que pot tenir un paper en la progressió del melanoma. Alguns polimorfismes del receptor 1 de la melanocortina, MCR1, han estat relacionats amb una especial sensibilitat a la radiació U.V. i al color roig del cabell. Els portadors d'aquestes variants tenen un risc superior a desenvolupar melanoma que la resta de la població.

Hipòtesi de treball

Hipòtesis de treball

1. En el braç curt del cromosoma 9 (9p) existeix un o varis gens implicats en l'origen i desenvolupament del melanoma.
2. Algun d'aquests gens seria un gen supressor de tumors que actuaria a nivell cel·lular de forma recessiva a nivell del tumor, amb segregació codominant en els casos familiars, implicant una predisposició a melanoma.
3. La identificació de mutacions germinals d'un gen de melanoma en portadors sans ha de permetre el diagnòstic precoç de la malaltia, millorant la prevenció, el control i l'evolució dels casos familiars.
4. Altres gens, localitzats o no a la regió 9p, podrien estar implicats en la progressió tumoral, tenint un paper en l'evolució de la malaltia i contribuint al millor o pitjor pronòstic de la mateixa.

Objectius concrets

Objectius concrets

1. Identificar loci de predisposició i progressió tumoral pel melanoma al braç curt del cromosoma 9 (9p), mitjançant estudis en tumors de pèrdues d'heterozigositat (LOH) i de la identificació de regió mínima delecionada (RMD); i mitjançant l'estudi de lligament en famílies.
2. Identificar mutacions en els gens ubicats en la regió cromosòmica 9p en tumors de melanomes esporàdics (mutacions somàtiques), i en individus predisposats a patir melanoma, casos familiars i melanomes múltiples (mutacions germinals).
3. Establir el valor de les mutacions al gen *CDKN2A* en el melanoma esporàdic i familiar.
4. Correlacionar l'evolució clínica dels pacients i la progressió tumoral amb les alteracions moleculars identificades.

Resultats

Chromosome 9p Deletions in Cutaneous Malignant Melanoma Tumors: The Minimal Deleted Region Involves Markers outside the p16 (*CDKN2A*) Gene

Susana Puig, Anna Ruiz, Conxi Làzaro, Teresa Castel, Michael Lynch, Josep Palou, Antoni Vilalta, Jean Weissenbach, Jose María Mascaró, and Xavier Estivill

Am. J. Human. Genet., 57: 395-402, 1995

Finalitat del Treball

La finalitat d'aquest treball era estudiar el paper de les delecions en el braç curt del cromosoma 9 en un grup de melanomes (tumors primaris i metastàtics), el més ample possible i en el que foren representats els diferents estadis evolutius del melanoma. Interessava també intentar correlacionar les troballes moleculars amb els diferents estadis de la malaltia. Posteriorment, en identificar-se el possible paper del gen *CDKN2A* en el desenvolupament del melanoma, es van estudiar també les delecions homozigotes d'aquest gen ubicat a 9p.

Resum del Treball

Es van estudiar 12 marcadors microsatèl·lit ubicats al braç curt del cromosoma 9, a la regió 9p13-23, cobrint una distància genètica d'aproximadament 24 centiMorgans. Dos d'aquests marcadors havien estat prèviament estudiats en línies de melanoma per Fountain et al l'any 1992 (*IFNA* i *D9S126*). Els altres 10 marcadors van ser cedits per J. Weissenbach i provenien de la col·lecció de marcadors microsatèl·lits de Généthon. Tots aquests marcadors es van estudiar mitjançant PCR, comparant el producte obtingut de l'amplificació de la mostra de DNA del tumor i de la mostra de DNA de teixit sa (limfòcits) del mateix malalt. Per estudiar les delecions homozigotes dels marcadors microsatèl·lits i del gen *CDKN2A* es van utilitzar les reaccions de PCR multiplex (en elles s'amplifica un locus control alhora que el marcador problema).

Varen ser estudiades mostres de melanoma provinents de 46 malalts diferents i no relacionats. Donat que d'alguns malalts es disposava de més d'una mostra (tumor primari i metastàtic), el total de tumors estudiats era de 54. D'aquests 30 eren primaris, estant-hi representats tots el tipus clinicopatològics de melanoma. Fins i tot varen ser estudiats 3 melanomes *in situ*.

Resultats

1. Vàrem trobar pèrdues d'heterozigositat (LOH) en 46% dels tumors estudiats (incloent-hi 2 dels melanomes *in situ* estudiats).
2. Només es va demostrar una deleció homozigota d'una regió del braç curt del cromosoma 9 en un tumor.
3. Va quedar definida per 5 tumors una regió mínima comuna delecionada (de *D9S126* a *D9S259*).
4. No es van poder demostrar delecions homozigotes que afectessin a *CDKN2A*.
5. En 4 tumors les LOH no afectaven la regió de *CDKN2A*.
6. No hi havia diferència estadísticament significativa entre el nombre de tumors primaris amb delecions i el nombre de tumors metastàtics amb delecions.
7. La pèrdua de 8 o més marcadors microsatèl·lits correlacionava significativament ($p < 0.002$) amb un pitjor pronòstic de la malaltia (tumor metastàtic o primaris amb un alt risc de metastasi, segons criteri de Bagley).
8. Dins els tumors primaris, el 87.5% dels tumors amb grans delecions (8 o més marcadors) tenien un alt risc de metastasi, segons criteri de Bagley, mentre que només el 18% dels primaris amb delecions petites tenien al risc de metastasi, segons criteri de Bagley ($p < 0.001$).

(Article sotmès per publicació)

Large deletions of chromosome 9p in cutaneous malignant melanoma identify patients with a high risk of developing metastases

Susana Puig, Josefa Castro, Pere J. Ventura, Anna Ruiz, Carlos Ascaso, Josep Malvehy, Xavier Estivill, Jose M. Mascaró, Mario Lecha, Teresa Castel for the Malignant Melanoma Group*

Department of Dermatology. Hospital Clínic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain (S. P., J. C., J. M., J. M. M., M. L. and T. C.).

Epidemiology and Biostatistics Unit. Fundació Clínic. Hospital Clínic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain (P. J. V. and C. A.).

Medical and Molecular Genetics Center, Institut de Recerca Oncològica, Barcelona, Spain (A. R. and X. E.).

Members of the Hospital Clínic Malignant Melanoma Group:

Dermatology Service: T. Castel, S. Puig, J. Malvehy, R. Martí, A. Vilalta, J. Palou, J. Soler, J. Castro, E. Yachi; *Immunology Service:* R. Vilella, J. Milà; *Oncology Service:* B. Mellado; *Surgery Service:* J. Piulachs, R. Rull; *Nuclear Medicine Service:* S. Vidal. *Genetics Service:* M. Milà.

Corresponding Author: S. Puig, Department of Dermatology, Hospital Clínic / IDIBAPS, Casanova 143, 08036 Barcelona, SPAIN. Tel: 34 93 227 54 00 ext 2728; FAX: 34 93 227 54 38. Email: 25916sps@comb.es

Acknowledgments:

This work was partially supported by the personal grant 1995FI 09102 to S: Puig from the CIRIT (Generalitat de Catalunya).

ABSTRACT

Background: Cutaneous melanoma (CMM) is an aggressive tumour with a high metastatic potential. Deletions of chromosome 9p have been detected in CMM, some of which involving *CDKN2A/p19ARF* genes.

Methods: Loss of heterozygosity (LOH) of 16 microsatellite markers on 9p and mutations in the *CDKN2A/p19ARF* genes had been previously studied in 32 melanoma patients by our group. 9p deletions were detected in 15 primary tumours (45.5%) and now correlated with the clinical outcome during 5 years and compared with classical prognostic factors.

Results: Eight of the 32 patients developed metastases (25%). The metastases were all detected within 768 days of the initial diagnosis. The patients without metastases were last monitored at least 1621 days after diagnosis. None of the 21 patients with more than 8 microsatellites conserved developed metastases whereas all of the 8 patients which developed metastases had 8 or more markers deleted. The sensitivity of this analysis to predict metastases was 100% (specificity 84%) whereas the sensitivity for the same sample using Breslow>3 mm was 62.5% (specificity 68%).

Conclusions: LOH of 8 or more of 9p microsatellite markers is a useful prognostic factor to predict the development of metastases in the first 4.4-6.3 years (1621-2294 days). Furthermore, strong evidence arises for the existence of several genes implicated in malignant melanoma progression in chromosome 9p.

INTRODUCTION

Cutaneous malignant melanoma (CMM) is a very aggressive tumour. At the time of diagnosis, most melanomas are a local disease but with a high potential for developing metastases in the following years which is the actual outcome in more than 24% of patients¹. For patients in stage I and II (local disease) at the first presentation, the main prognostic factors are thickness² and Clark's levels^{3,4}. Thickness is a more objective measure than Clark's³ level but very thin tumours may recur^{5,6,7}. Conversely, very thick tumours may not prove fatal within the expected period⁸. Several treatments have been assayed as complementary therapies in melanoma in attempts to minimise the risk from metastases when the patients are disease free. The treatment of disseminated disease is discouraging with less than 10% of patients surviving after 5 years⁹. An important challenge is to identify the patients that are at risk from metastases, allowing the selection of those patients that need complementary therapy and avoiding toxicity and costly treatment for most patients.

In an effort to understand the biology and clinical behaviour of CMM many molecular analyses have been performed. The most common genetic alteration studied is the loss of heterozygosity (LOH) for a given segment of some chromosomes using polymorphic markers. This approach works assuming that the genes responsible for melanoma are typical tumour suppressor genes with a recessive mode of action and that inactivation of both alleles allows tumour development. Molecular analyses of tumours and tumour-derived cell lines^{10,11,12,13} have identified the region 9p21-p22 as a site of frequent hemizyosity and homozygous deletions in melanoma. In addition, genetic linkage for a melanoma gene has been shown to the same region on chromosome 9p¹⁴. Our research group analysed 12 microsatellite markers on 9p13-23 in 54 paired tumours (primary and metastases) and normal tissues¹³. Nearly 50% of the tumours showed LOH at 9p. Several clinico-pathological types of CMM had deletions of 9p including two of the three *in situ* tumours studied, suggesting that a tumour suppressor gene at 9p21 is involved in the early stages of the disease. However, when considering the size of the deletion, the loss of 8 or more markers correlated

significantly with worse prognosis when Clark³ and Breslow² were compared together (Bagley criteria)¹⁵ ($P < .002$), suggesting that more than one tumour suppressor gene at 9p could be involved in the progression of CMM. The focus of these 9p21 deletions seemed to be the *p16* (*CDKN2A*) gene, which acts as an inhibitor of cyclin-dependent kinase 4¹⁶. Mutations in *CDKN2A* have been identified in a high proportion of tumour cell lines of several types including melanoma^{17,18}. The most frequent mechanism of mutation in melanoma cell lines is homozygous deletion in nearly 60% of lines, but some point mutations have also been described. Surprisingly, only a small proportion of uncultured CMM tumours has *CDKN2A* point mutations^{13,19,20,21,22}. This suggests that most mutations occur during cell growth rather than in the initial stages of the neoplasia or that they provide an additional growth advantage in culture. Although it is clear that *p16* is a melanoma gene for a number of families^{23,24,25,26}, 9p deletions in some tumours do not involve *p16* or *p15* even though when this locus is nearly saturated with microsatellites²². This fact strongly supports the idea that *p16* is not the only 9p21 melanoma gene and places a CMM locus more centromeric than these genes²². We present here a correlation study between deletions of 9p in CMM tumours and their clinical evolution in an attempt to identify better prognostic factors. We have found that deletion of 8 or more of the microsatellite markers in chromosome 9p is a useful prognostic factor to predict the development of metastases in the first 4.4-6.3 years. The study also strongly suggests that several tumour suppressor genes implicated in malignant melanoma progression are located in 9p.

SUBJECTS AND METHODS

Patients and tumours

Thirty-two CMM patients whose primary melanoma tumors had been previously studied were included. The clinicopathological characteristics of the primary tumours studied were as expected incidence in our population: 17 superficial spreading CMM, 6 Nodular CMM, 2 *in situ* melanomas, 1 Lentigo maligno melanoma and 6 Acral Lentiginous CMM. Detailed description of the tumor's characteristics was reported in previous paper from Puig et al¹³. Clinical follow up of the patients was done between 4.44 and 6.28 years (1621-2294 days) from the initial diagnosis (Table 1).

LOH analysis of 9p

The microsatellite markers studied were: *D9S156*, *D9S157*, *D9S162*, *IFNA*, *AFM220XF2*, *P16AC*, *D9S171*, *D9S126*, *D9S265*, *D9S259*, *GATAP16148*, *AFM218XG11*, *D9S169*, *D9S161*, *D9S270* and *D9S165*, which are located in 9p (Figure 1). Standard PCR conditions were used as described^{13,22}. Homozygous deletions of the region and point mutations of *CDKN2A* and *p19ARF* were also studied²². The LOH and mutational analysis results were described in previous papers^{13,22}. However, only LOH analysis was useful in the correlation with clinical evolution and development of metastases. The parameter used for clinical correlation was the number of microsatellite deleted being the optimum cut-off point the deletion of at least 8 markers (data not shown).

Statistical analysis

To evaluate the association between categorical variables, Pearson's χ^2 or Fisher's exact test (if the expected frequency was less than 5) were used. Sensitivity and specificity were calculated using standard formulae²⁷. The 95% CI were obtained by the exact Binomial method.

RESULTS

Eight of the 32 patients whose primary tumours were studied, developed metastases (25%). All the metastases were detected within 0-768 days after the first diagnosis. The patients that have not developed metastases, whose primary tumours were studied, were last monitored after at least 1621 days (Table 1). None of the 21 primary CMMs with more than 8 microsatellites conserved developed metastases whereas all of the 8 primary CMMs which developed metastases had lost 8 or more markers (Figure 2). The sensitivity of this analysis to predict metastases was 100% and the specificity was 84% whereas the specificity and sensitivity of Clark's level (when grouped I-II vs III-IV-V) for the same tumour samples were 50% and 68%, respectively (Table 2). Also, the sensitivity and specificity of the Breslow and Bagley prognostic groups were hardly better than Clark's (Table 2). There are two markers (*D9S171* and *D9S161*) which when deleted, are always encompassed within a loss of 8 or more markers (data not shown). Therefore, the analysis of these two markers is also useful to predict metastases (Table 2). There were no differences between primary tumours that developed metastases and those that did not related to the Breslow, but a relationship exists between Breslow and the number of markers deleted (Table 3).

DISCUSSION

The finding that all the primary tumours studied from patients that have developed metastases had LOH of 8 or more of the microsatellite markers studied at 9p strongly supports that this is a useful prognostic factor to predict the development of metastases in the first 4.44-6.28 years (1621-2294 days). Eventhough the sample studied is small, the facts that the number of patients that develop metastases was as expected (nearly 25%) and that the periods of follow up for patients without metastases were longer than in patients with metastases (and cover the high risk period of the first 5 years) validate our results. Nowadays, with the introduction of complementary therapy with high dose interferon- α ^{2a} ²⁸, it is becoming more important to identify those patients with a higher risk of developing metastases who could benefit from high dose therapy.

Another interesting point is the discussion of the mechanisms by which these large 9p deletions are related to tumour metastasis. These data strongly suggest that several genes implicated in malignant melanoma progression are located in 9p²². The haploinsufficiency of several genes implicated in different pathways could be one explanation²⁹. There are several interesting genes in this region such as the interferon α and β clusters, genes coding for cell-cycle regulators like p16, p15 and p19arf as well as other genes probably involved in metastasis progression (angiogenesis, intercellular signalling). Recently the reduction of tumorigenicity in athymic (*nu/nu*) mice of the human melanoma cell line UACC-903 after transfection of incomplete chromosome 9 has been published.²⁸ Lack of *CDKN2A* and *CDKN2B* in the chromosomes 9 transfected strongly support the existence of other important tumor suppressor genes located in 9p.

One important question arises from our results: Why did we only detect 9p LOH in about half of the metastatic melanoma tumours in our previous works¹³? All of the metastatic tumours studied then, which had LOH at 9p, had lost 8 or more markers, but we did not detect LOH at 9p in 60% of the metastatic tumours. Seven of the metastatic tumours without 9p deletions were ganglionar micrometastases with also normal lymphocytes in

the samples; four metastases were from patients whose primary tumours have been studied and which had large deletions (more than 8 markers). The examination of every sample leads us to suspect that in a number of tumour samples we do not detect LOH because of contamination by normal cells and in others possibly because of homozygous deletions. The development of late metastases is not studied in our work and large 9p deletions may not be involved in those cases.

REFERENCES

- 1- Gamel JW, George SL, Stanley W, Sigler HF. Skin melanoma. Cured fraction and survival time as functions of thickness, site, histologic type, age and sex. *Cancer* 1993; **72**: 1219-1223.
- 2- Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; **172**: 902-908
- 3- Clark WH Jr, From L, Bernardino EH et al. Histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 1969; **29**: 705-727
- 4- Buttner P, Garbe C, Bertz J, et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumour thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* 1995; **75**: 2499-2506.
- 5- Kelly JW, Sagebiel RW, Clyman S et al. Thin level IV malignant melanoma-subset in which level is the major prognostic indicator. *Ann Surg* 1985; **202**: 98-103.
- 6- Shaw HM, McCarthy WH, McCarthy SW, et al. Thin malignant melanoma and recurrence potential. *Arch Surg* 1987; **122**: 1147-1150.
- 7- Blessing K, McLaren KM, McLean A, et al. Thin malignant melanomas (>1.5 mm) with metastasis: a histological study and survival analysis. *Histopathology* 1990; **17**: 389-395.
- 8- Rivers JKR, McCarthy SW, Shaw HM, et al. Patients with thick melanomas surviving at least 10 years: histological, cytometric and HLA analyses. *Histopathology* 1991; **18**: 339-346.
- 9- Legha SS, Ring S, Eton O, et al: Development of biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 1752-1759.
- 10- Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN, Lahti J, Kidd VJ, Housman DE, Dracopoli NC. Homozygous deletions within

human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**:10557-10561.

11- Walker GJ, Palmer JM, Walters MK, et al. Refined localization of the melanoma (MLM) gene on chromosome 9p by analysis of allelic deletions. *Oncogene* 1994; **9**: 819-824.

12- Weaver-Faldhaus J, Gruis NA, Neuhausen S, et al. Localization of a putative tumour suppressor gene by using homozygous deletions in melanomas. *Proc Natl Sci USA* 1994; **91**: 7563-7567.

13- Puig S, Ruiz A, Lazaro C, Castel T, Lynch M, Palou J, Vilalta A, Weissenbach J, Mascaro JM, Estivill X. Chromosome 9p deletions in cutaneous malignant melanoma tumours: the minimal deleted region involves markers outside the *p16 (CDKN2)* gene. *Am J Hum Genet* 1995; **57** :395-402.

14- Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, Olopade OI, Diaz MO, Kwiatkowski DJ, Piepkorn MW, Zone JJ, Skolnick MH () Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-22. *Science* 1992; **258** : 1148-1152

15- Bagley FH, Cady B, Lee A, Legg MA. Changes in clinical presentation and management of malignant melanoma. *Cancer* 1981; **47**: 2126-2134

16- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; **366**:704-707.

17- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types. *Science* 1994; **264**: 436-440.

18- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclindependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; **368**: 753-756.

19- Ohta M, Nagai H, Shimizu M, Rasio D, Berd D, Mastrangelo M, Singh AD, Shields JA, Shields CL, Croce CM, Huebner K. Rarity of somatic

mutations and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDKI4, in melanoma. *Cancer Res* 1994; **54**:5269-5272.

20- Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Frye Ch, Eeles R, Orlow I, Lacombe L, Ponce-Castaneda V, Lianes P, Latres E, Skolnick M, Cordon-Cardo C, Kamb A. Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumour suppression. *Am J Pathol* 1995; **146**: 1199-1206.

21- Reed JA, Loganzo F, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumour suppressor gene in melanocytic lesions correlates with intensive stage of tumour progression. *Cancer Res* 1995; **55**: 2713-2718

22- Ruiz A, Puig S, Lynch M, Castel T, Estivill X. Retention of the *CDKN2A* locus and low frequency of point mutations in primary and metastatic cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer* 1998; **76**: 312-316.

23- Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. Germline *p16* mutations in familial melanoma. *Nature Genetics* 1994; **8**: 15-21.

24- Kamb A, Shattuck-Eidens, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick NH, Cannon- Albright LA. Analysis of the *p16* gene (*CDKN2*) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genetics* 1994; **8**: 22-26.

25- Puig S, Ruiz A, Castel T, Volpini V, Malvey J, Cardellach F, Lynch M, Mascaro JM, Estivill X. Inherited susceptibility to several cancers but absence of linkage between dysplastic nevus syndrome and *CDKN2A* in a melanoma family with a mutation in the *CDKN2A* (*P16^{INK4A}*) gene. *Human Genet* 1997; **101**: 359-364.

26- Ruiz A, Puig S, Malvey J, et al. *CDKN2A* mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. *J Med Genet* 1999; **36** (in press).

27- Armitage P., Berry G. 1994. *Statistical Methods in Medical Research*. 3rd ed. Oxford. Blackwell Scientific Publications.

28- Kirwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, et al. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: The Eastern Cooperative Oncology Group trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 7-17.

29- Glendening JM, Flores JF, Walker GJ, Stone S, Albino AP, Fountain JW. Homozygous loss of the p15INK4B gene (and not the p16INK4A gene) during tumor progression in sporadic melanoma patient. *Cancer Res* 1995; **55**: 5531-5535.

30- Parris CN, Harris JD, Griffin DK; Cuthbert AP, Silver A Jr, Newbold RF. Functional evidence of novel tumor suppressor genes for cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res* 1999; **59**: 516-520.

LEGENDS AND FIGURES

Figure 1 Schematic representation of the 9p region indicating the positions of the microsatellite markers and genes studied.

Figure 2 Graphic representation of the number of deleted markers in two groups: primary tumours that have developed metastases, and primary tumours that have so far not developed metastases. Y = number of markers deleted.

Table 1 Days elapsed between the diagnosis of the primary tumour and the development of metastases or the latest examination (in tumours that have not developed metastases).

	N	Min (days)	Max (days)
Metastases	8	0	767
No metastases	25	1621	2294

Table 2 Sensitivity and specificity of Clark, Breslow, Bagley, D9S171, D9S161, and LOH of 8 or more markers.

	Sensitivity %-CI 95%		Specificity %-CI 95%	
CLARK*	50.0	15.7-84.3	68.0	46.5-85.0
BRESLOW**				
≥ 0.75	100		20.0	6.8-40.7
≥ 1.5	75.0	34.9-96.8	44.0	24.4-65.1
≥ 3	62.5	24.5-91.5	68.0	46.5-85.0
BAGLEY***				
≥ M	87.5	47.3-99.7	24.0	9.3-45.1
≥ H	37.5	8.5-75.5	68.0	46.5-85.0
LOH D9S171	87.5	47.3-99.7	86.7	59.5-98.3
LOH D9S161	80.0	28.3-99.5	82.4	56.6-96.2
8 or more LOH	100		84.0	63.9-95.5

*Clark level was considered grouped: I-II, III-IV-V.

**Breslow was grouped.

***Bagley was grouped.

Table 3 Absence of relationship between Breslow level and development of metastases. $\chi^2 = 5.00$, $df=3$, $p=0.17$. Relationship between Breslow and 9p deletion of 8 or more markers. $\chi^2 = 11.00$, $df=3$, $p=0.01$.

Breslow	< 8 LOH	8 o >8 LOH
<hr/>		
< 0.76		
Metastases	0	0
No metastases	5	0
0.76-1.5		
Metastases	0	3
No metastases	5	1
1.6-3		
Metastases	0	0
No metastases	7	0
>3		
Metastases	0	4
No metastases	3	3
<hr/>		

Figure 1

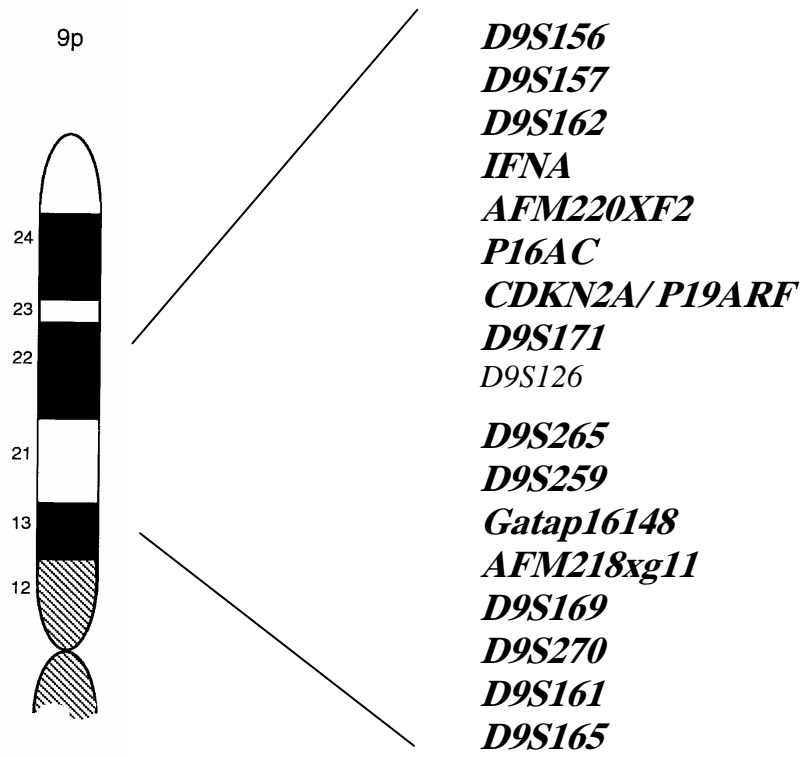
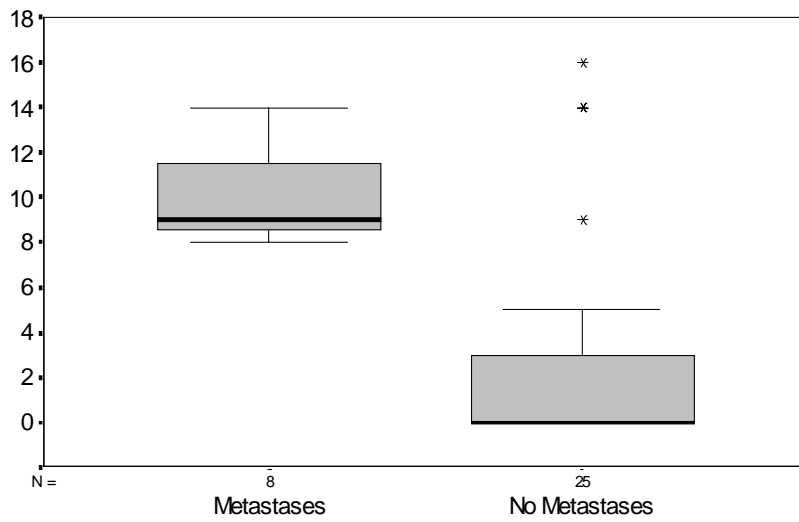


Figure 2



Finalitat del Treball

La finalitat d'aquest treball era establir la correlació entre les troballes moleculars a nivell del braç curt del cromosoma 9 (LOH) estudiades en els tumors primaris i l'evolució clínica dels pacients durant un període aproximat de 5 anys per tal d'establir el valor pronòstic o predictiu de metàstasi dels estudis de LOH.

Resum del Treball

Es van estudiar 33 tumors primaris de 32 pacients realitzant estudis de pèrdua d'heterozigositat (LOH) de 16 marcadors microsatèl·lits ubicats al braç curt del cromosoma 9 (veure treball de l'annexa). Es va estudiar també la presència de mutacions puntuals o delecions homozigotes de *CDKN2A* o *p19arf*. Es va realitzar el seguiment dels pacients durant un mínim de 4.4 anys recollint el temps lliure de malaltia i l'aparició o no de metàstasi. Vuit dels pacients controlats varen fer metàstasis mentre que els altres 24 es mantenen lliures de malaltia després de 4.4 a 6.3 anys de seguiment. Es va avaluar per cada pacient el nivell de Clark, l'índex de Breslow i el Bagley tenint en conte el seu tumor primari. Donat el baix o nul nombre de mutacions identificades a *CDKN2A* i *p19arf* varen ser despreciats aquests resultats per a realitzar la correlació pronòstica. Es va estudiar el punt de tall adequat per avaluar el nombre de marcadors microsatèl·lits perduts com a índex pronòstic. Es van analitzar estadísticament les dades obtingudes per tal d'establir la sensibilitat i especificitat (també els seus intervals de confiança) dels índexs pronòstics clàssics i també de l'estudi de LOH per predir metàstasi els primers 4.4-6.3 anys. Es varen comparar els diferents índexs pronòstics entre ells.

Resultats

1. 8 dels 32 pacients estudiats varen desenvolupar metàstasis (25%).
2. En els 8 pacients que varen desenvolupar metàstasis, aquestes apareixeran abans del dia 768 mentre que els 24 pacients que es mantenen lliures de malaltia han estat controlats un mínim de 1621 dies i un màxim de 2294 dies (4.4 – 6.3 anys).
3. Tots els pacients que han desenvolupat metàstasis tenien pèrdues d'heterozigositat de com a mínim 8 marcadors microsatèl·lits del braç curt del cromosoma 9
4. Cap dels 21 pacients que no perdien 8 o més marcadors microsatèl·lits han desenvolupat metàstasi en un seguiment mínim de 4.4 anys
5. La pèrdua de 8 o més marcadors microsatèl·lits del braç curt del cromosoma 9 té una sensibilitat del 100% i una especificitat del 84% (IC 63.9-99.5) per predir l'aparició de metàstasis en un període de 4.4 a 6.3 anys.
6. Per a la mateixa mostra els índexs pronòstics clàssics tenen una sensibilitat i especificitat menor: Clark agrupat sensibilitat del 50% (IC 15.7-84.3), especificitat 68% (IC 46.5-85.0); Breslow igual o superior a 3 sensibilitat del 62.5 (IC 24.5-91.5), especificitat de 68.0 (IC 46.5-85.0).
7. Hi ha dos marcadors microsatèl·lits que quan presenten LOH aquestes van associades sempre a pèrdues de com a mínim 8 marcadors i que per tant són representatives del que succeeix amb la resta. La LOH de *D9S171* té una sensibilitat 87.5 (IC 47.3-99.7) i una especificitat de 86.7 (IC 59.5-98.3) i la LOH de *D9S161* té una sensibilitat 80.0 (IC 28.3-99.5) i una especificitat de 82.4 (IC 56.6-96.2) per a predir l'aparició de metàstasis.
8. En la nostra mostra no existeix relació estadísticament significativa entre el Breslow i l'aparició de metàstasi, però sí, entre el Breslow i la pèrdua de marcadors.

Inherited susceptibility to several cancers but absence of linkage between dysplastic nevus syndrome and *CDKN2A* in a melanoma family with a mutation in the *CDKN2A* (*p16INK4A*) gene

Susana Puig, Anna Ruiz, Teresa Castel, Victor Volpini, Josep Malvehy, Francesc Cardellach, Michael Lynch, Jose María Mascaró, and Xavier Estivill

Hum. Genet., 101: 359-364, 1997

Finalitat del Treball

La finalitat d'aquest treball era l'estudi molecular d'una família amb melanoma familiar (FAMMM sd) establint la relació entre les troballes moleculars i el fenotip dels diversos membres de la família.

Resum del Treball

En aquest treball s'estudia una família amb 4 casos de melanoma, 8 pacients afectes d'altres tipus de neoplàsies i 9 pacients amb sd del nevus clínicament atípic o displàstic. S'obté DNA de 24 membres de la família. Es realitzen estudis de lligament genètic mitjançant l'anàlisi per PCR dels microsatèl·lits *D9S157*, *D9S171*, *D9S169* i *D9S165*. S'estudien les mostres pels 3 exons del gen *CDKN2A* mitjançant SSCA (anàlisi de la conformació en cadena senzilla) i es seqüencien les bandes anòmales per identificar mutacions en l'esmentat gen. S'analitzen estadísticament els resultats i en relació a la incidència de melanoma, d'altres neoplàsies i nevus clínicament atípics.

Resultats

1. S'identifica una mutació a l'exó 2 de *CDKN2A* en el cas índex estudiat (358delG). Es tracta d'una mutació que consisteix en una deleció d'una base que comporta un canvi en la pauta de lectura (frameshift mutation) i una aturada prematura o codó d'acabament.
2. La mutació identificada és present en els 4 casos de melanoma, en 3 dels pacients afectes d'altres neoplàsies (de la resta de pacients que tenen d'altres neoplàsies no es coneix l'estatus d'aquest gen) i en dos pacients amb síndrome del nevus clínicament atípic o displàstic.
3. Els portadors de la mutació 358delG d'aquesta família tenen un risc superior de desenvolupar d'altres neoplàsies (neoplàsia de mama i neoplàsia de pulmó) que l'esperat en la població d'origen ($p=0.001$)
4. L'anàlisi de lligament genètic dóna un Lod Score màxim de 1.18 pel gen *CDKN2A* pel melanoma.
5. L'anàlisi de lligament genètic exclou el locus *CDKN2A* com a responsable de la síndrome del nevus displàstic o atípic en aquesta família.
6. L'anàlisi de lligament genètic dóna un Lod Score màxim de 1.23 pel marcador *D9S171* per la síndrome del nevus displàstic o atípic en aquesta família.

CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia

Anna Ruiz, Susana Puig, Josep Malvehy, Conxi Làzaro, Michael Lynch, Anna M Gimenez-Arnau, Lluís Puig, Julian Sánchez-Conejo, Xavier Estivill, Teresa Castel

J. Med. Genet., 36: 0-3, 1999

Finalitat del Treball

La finalitat d'aquest treball era l'estudi molecular de 34 famílies amb melanoma familiar i 9 pacients amb melanomes primaris múltiples o melanomes associats a d'altres neoplàsies.

Resum del Treball

En aquest treball s'analitzen 56 pacients que pertanyen a 34 famílies amb melanoma familiar i 9 pacients afectes de més d'un melanoma primari o bé un melanoma associat a una altra neoplàsia. S'estudien les regions codificants del gen *CDKN2A* i *p19ARF*. S'estudia també l'exó 2 de *CDK4*. Es duen a terme anàlisis de lligament genètic utilitzant els marcadors microsatèl·lits *D9S162*, *D9S171* i *D9S161*.

Resultats

- 1) El 17% de les famílies estudiades presenta una mutació a la regió codificant de *CDKN2A*.
 - a) El 33.3% (3 de 9 famílies) amb tres o més casos de melanoma tenen mutacions a *CDKN2A*.
 - b) El 13% (2 de 15 famílies) amb dos casos de melanoma i nevus clínicament atípics (NCA) tenen mutacions a *CDKN2A*.
 - c) El 10% (1 de 10 famílies) amb un cas de melanoma associat a d'altres membres amb NCA tenen mutacions a *CDKN2A*.
- 2) Les mutacions identificades són totes mutacions que comporten el canvi d'un aminoàcid per un altre (missense mutations) excepte una que és un canvi en la pauta de lectura per la deleció d'un parell de bases (l'estudi d'aquesta família està reportat en l'article previ que forma part d'aquesta tesi).
- 3) Les mutacions *missense* identificades són:
 - a) V59G (176 T→G) present en un pacient afecte de MM i NCA. Aquesta mutació ja s'ha descrit diverses vegades en melanoma familiar.
 - b) G101W (301G→T) present en tots els pacients afectes de melanoma de dues famílies no relacionades. Aquesta mutació ja s'ha descrit diverses vegades en melanoma familiar.
 - c) D84Y (250G→T) mutació prèviament no descrita que afecta el tercer "ankyrin repeat".
 - d) R87W (259C→T) mutació prèviament no descrita que afecta el tercer "ankyrin repeat".
- 4) No s'han identificat mutacions en els pacients amb melanoma múltiple sense història prèvia o posterior de melanoma familiar ni en els casos de melanoma associat a d'altres neoplàsies.
- 5) Una de les famílies estudiades exclou lligament a 9p21.

Bases genètiques del Melanoma esporàdic

De la mostra estudiada: Tumors primaris i tumors in situ

Aquest treball té l'interès d'estudiar els tumors directament i no les línies cel·lulars establertes a partir d'un tumor. Les cèl·lules que creixen en cultiu poden anar presentant diverses mutacions durant el transcurs dels processos *in vitro*. D'altra banda, les cèl·lules que creixen del tumor primari que es cultiva, són aquelles que millor s'adapten a un creixement *in vitro* i per tant són d'alguna manera una selecció de les cèl·lules originàries. Això fa que els resultats obtinguts en línies cel·lulars no siguin representatius del que succeeix en el tumor. Les troballes en tumors primaris, i sobre tot en els tumors *in situ*, ens donen més idea dels canvis moleculars precoços possiblement implicats en la gènesi del càncer.

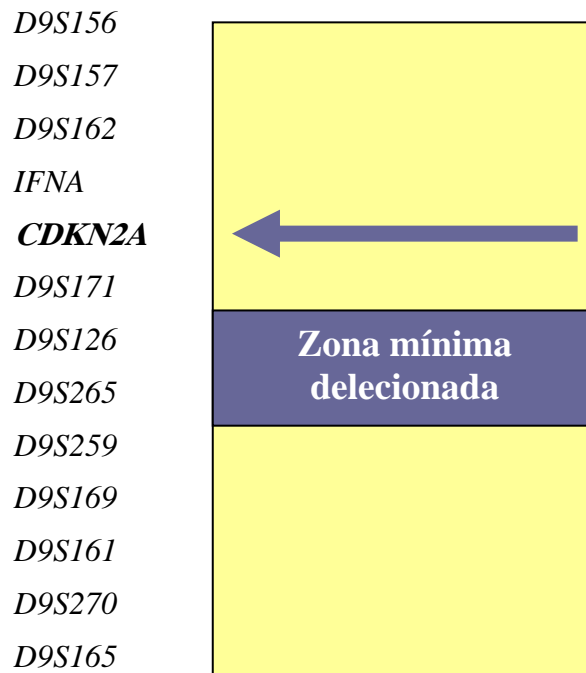
L'inconvenient principal de treballar en tumors és per una banda que la mostra inicial és petita i limitada, i per l'altra, que les mostres estudiades poden estar contaminades amb teixit sa. Això fa que els resultats positius tinguin una gran força, però que els resultats negatius hagin de ser valorats amb mesura. En aquest treball, el percentatge de LOH és similar al descrit per altres autors en tumors primaris, el que fa pensar que la contaminació en els primaris no és molt important. Les mostres que tal vegada poden estar més contaminades siguin les metàstasis ganglionars de MM, on l'existència de limfòcits pot impedir la identificació de LOH o bé de delecions homozigotes.

Dels resultats obtinguts: les delecions al cromosoma 9p són un canvi inicial en el desenvolupament de melanoma amb una clara correspondència pronòstica

Les LOH a 9p21 són un canvi freqüent i inicial en el desenvolupament del melanoma. Aquest va ser el primer cop que es demostrava una LOH en MM *in situ*. Aquest canvi era present en 2 dels 3 *in situ* estudiats. Aquesta troballa juntament amb el fet que la incidència de delecions és similar entre tumors primaris i metastàtics dóna idea que les LOH a 9p succeeixen en fases inicials del desenvolupament del melanoma.

Les delecions homozigotes de 9p21 són menys freqüents en tumors que en línies cel·lulars. Aquesta troballa confirma que els resultats en línies cel·lulars són útils però no reflexa exactament el que succeeix en un tumor “*in vivo*”. D'altra banda, el fet d'haver identificat una deleció homozigota demostra que la tecnologia utilitzada és capaç de detectar aquestes delecions fins i tot en mostres de tumor estudiades mitjançant PCR. La deleció homozigota detectada no afecta la zona de *CDKN2A*, el que reforça la idea que deu haver-hi d'altres gens a 9p importants en el desenvolupament del melanoma. El fet de no haver demostrat delecions homozigotes de *CDKN2A* reforça l'afirmació que alteracions en aquest gen són menys freqüents en els tumors del que se sospitava pels estudis en línies cel·lulars. Les línies tenen pèrdues que poden aparèixer durant el cultiu o bé pot ser que les pèrdues suposin un avantatge de creixement en cultiu cel·lular i per tant afavoreixin l'establiment de les línies.

La zona mínima delecionada exclou *CDKN2A* com a primera diana. D'altres gens implicats en l'inici del melanoma. Hi ha una zona mínima delecionada definida per 5 tumors. Aquesta zona mínima va de *D9S126* a *D9S259*, i no afecta la regió de *CDKN2A*. És, doncs possible que hi hagi altres gens en aquesta regió que siguin la primera diana per iniciar-se un melanoma i que les alteracions a *CDKN2A* siguin un canvi posterior.



Correlació pronòstica D'altres gens implicats en l'evolució. Un dels punts més atractius del primer treball és l'anàlisi de la correlació entre les dades moleculars i el pronòstic establert mitjançant factors clínics i histològics clàssics. Les delecions que afecten molts marcadors microsatèl·lits (8 o més) són estadísticament més freqüents ($p < 0.002$) en els tumors de mal pronòstic (metàstasi i primaris amb Bagley d'alt risc de metàstasi). Si aquesta anàlisi es fa només en els primaris, la diferència és més marcada ($p < 0.001$), només el 18% dels tumors primaris sense delecions o amb delecions petites tenen un alt risc de metàstasi valorant el Bagley mentre que el 87.5% dels primaris amb grans delecions (de 8 o més marcadors) tenen un risc elevat de metàstasi. D'aquesta troballa es deriven dues conseqüències diferents: 1. Possiblement la pèrdua de microsatèl·lits a 9p pugui ser un marcador molecular de progressió de malaltia altament sensible i específic. 2. Possiblement la pèrdua de zones àmplies de 9p

estigui implicada en l'evolució del melanoma, perquè en aquesta regió s'hi trobin diversos gens importants en el control del càncer i que la seva carència sigui un pas important per assolir la metastatització. És cert que les grans delecions podrien ser donades per inestabilitat genètica en tumors molt evolucionats, però el fet que aquest tipus de delecions sigui també present en tumors primaris poc evolucionats fa que aquesta suposició tingui poca força.

El seguiment de 32 pacients durant un període de temps que volta els 5 anys (segon treball) ens ha permès veure quins han estat els pacients que han desenvolupat metàstasis després de conèixer algunes característiques histològiques i moleculars dels seus tumors primaris. El percentatge de pacients que han fet metàstasis ha estat del 25%, nombre que s'ajusta al que es pot esperar quan valorem el melanoma en general sense conèixer més dades (un 20% dels melanomes faran metàstasis). Així doncs els pacients que es varen incloure en l'estudi inicialment s'han comportat tal com es podia esperar pel que fa a la incidència de metàstasi. D'altra banda, el fet que els pacients que han desenvolupat metàstasi ho hagin fet dins del període crític dels primers 2 anys, mentre que els pacients que no han desenvolupat metàstasi han estat seguits un mínim de 4.4 anys valida encara més els nostres resultats. Així doncs, la mostra estudiada i el seguiment realitzat creiem ha resultat adequat per a valorar paràmetres relacionats amb el risc de desenvolupar metàstasi de melanoma.

Les pèrdues d'heterozigositat de grans fragments de 9p són un indicador de mal pronòstic molt sensible i específic per predir el desenvolupament de metàstasi en un període proper als 5 anys.

El fet que els tumors primaris de tots els pacients que han desenvolupat metàstasis presentin LOH de com a mínim 8 marcadors de 9p confirma la sospita que les LOH a 9p són un molt bon índex pronòstic. El fet que aquesta sensibilitat del 100% s'acompanyi d'una especificitat alta, 84% (IC 63.9-99.5), dóna més valor predictiu (o precisió) a l'estudi de LOH de 9p en els tumors primaris. Aquesta especificitat i sensibilitat és molt superior a la dels índexs pronòstics clàssics (Clark, Breslow i Bagley) però alhora

representa o identifica el mateix. Així doncs existeix relació entre la pèrdua de 8 o més microsatèl·lits i els grups de Breslow més profunds. En els pacients inclosos en aquest treball no pot demostrar-se estadísticament la relació entre el Breslow del tumor i el posterior desenvolupament de metàstasi i això reflexa el que succeeix en la pràctica diària. Donada la baixa sensibilitat i especificitat del Breslow per establir el risc de metàstasi, en cada cas en concret el Breslow no resulta suficientment eficaç per establir el pronòstic del pacient.

La relació existent entre les grans delecions a 9p i la progressió del melanoma indica la possible importància de diversos gens ubicats en aquesta localització implicats en la progressió del melanoma.

El fet que els tumors primaris de tots els malalts que han desenvolupat metàstasis presentaven pèrdues d'heterozigositat de 8 o més microsatèl·lits de 9p, però en canvi, no presentaven metàstasis els pacients amb tumors primaris amb delecions petites, apunta a la hipòtesi que hi ha diversos gens importants en la progressió tumoral del melanoma ubicats a 9p. En un treball experimental s'ha revertit el fenotip maligne (disminució de la tumorigenicitat) d'una línia cel·lular de melanoma humà (portadora d'una delecio del cromosoma 9) administrada a ratolins atímics quan s'hi transfectava un cromosoma 9 incomplet. El cromosoma 9 que es transfectava no tenia els gens *CDKN2A* ni *CDKN2B* i per tant tampoc *p19ARF*. El fet que s'aconsegueixi revertir la tumorigenicitat de la línia cel·lular transfectada sense administrar aquests tres gens implica que hi ha d'haver d'altres gens importants en la tumorigènesi que es restauren en incorporar aquest fragment de cromosoma 9. A l'hora, aquest treball treu força a la hipòtesi que les grans delecions de 9p són presents en tumors de mal pronòstic com a conseqüència de la inestabilitat genètica que poden presentar aquests tumors, doncs si fos així no revertiria el fenotip amb la reintroducció dels gens delecionats. Aquests resultats experimentals valorats conjuntament amb les dades aportades pel treball que aquí es presenten indiquen per diferents camins que deuen existir diversos gens, diferents de *CDKN2A*, *CDKN2B* i *p19ARF*, implicats en la progressió tumoral del

melanoma ubicats a 9p.

El mecanisme pel qual grans delecions a 9p són responsables de la progressió de la malaltia pot ser per haploinsuficiència de diversos gens ubicats a 9p (cluster interferons alfa i beta, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *p19ARF*, o d'altres gens implicats en angiogènesis, senyals intracel·lulars,...)

Donat que en la majoria de melanomes primaris estudiats no s'ha aconseguit identificar dues mutacions en els dos al·lels de cap dels gens estudiats a 9p (deleció + mutació puntual, deleció homozigota o dues mutacions puntuals) cal pensar en d'altres mecanismes distints al del doble impacte per anul·lar la funció dels gens supressors de tumors. Un mecanisme alternatiu apuntat per diversos autors seria el de la haploinsuficiència de diversos gens supressors de tumors ubicats en una mateixa regió cromosòmica. Així doncs la pèrdua simultània d'un al·lel de molts gens ubicats a 9p, incloent-hi els inhibidors de cicle cel·lular (inhibidors de ciclins), citocines (cluster interferons alfa i beta), i potser d'altres gens de proteïnes implicades angiogènesi o senyals intracel·lulars, comportaria un avantatge de creixement i progressió tumoral.

Com es pot entendre que en un 60% dels tumors metastàtics estudiats no es detectin LOH de 9p?

De fet, en totes les metàstasis estudiades que presenten LOH la mida de la deleció és superior a 8 marcadors, en consonància als estudis realitzats en tumors primaris. La revisió de les peces estudiades va permetre veure que 7 de les metàstasis estudiades eren ganglionars on el teixit tumoral estava completament infiltrat per limfòcits normals. Aquests limfòcits intratumorals, amb el seu genoma intacte, són contaminants *in situ* de les PCR realitzades emmascarant la possible LOH del tumor. De fet, en 4 casos dels que disposaven del tumor primari i de la metàstasi vàrem comprovar que el tumor primari presentava una LOH de 8 o més marcadors que no es va poder evidenciar en l'estudi de la metàstasi. Aquest fet pot venir donat per tractar-se d'una metàstasi ganglionar on hi ha molta cel·lularitat no

tumoral contaminant la mostra, o bé per la presència de delecions homozigotes en la metàstasi emmascarades per la presència de genoma no tumoral en la mateixa mostra.

Aplicació pràctica dels resultats obtinguts.

Tot i la molt bona especificitat i sensibilitat de la pèrdua de 8 o més marcadors de 9p com a factor pronòstic per establir la possibilitat de metàstasi en un període proper a 5 anys, hi ha diversos inconvenients per a l'aplicació clínica d'aquest paràmetre. El primer és la necessitat d'estudiar teixit tumoral de la lesió primària. Amés, el tipus d'estudi que es realitza precisa una no menyspreable quantitat de DNA de bona qualitat, motiu pel qual les mostres provinents de teixits inclosos en parafina no solen ser útils, fent falta utilitzar mostres en congelació. D'altra banda, el tipus d'estudi que es realitza és costós i requereix d'una infraestructura no a l'abast en la majoria de centres. Donat que la LOH d'un dels dos microsatèl·lits *D9S171* i *D9S161* venia associada a la pèrdua de 8 o més marcadors vàrem valorar la sensibilitat i especificitat d'aquestes determinacions per a predir el desenvolupament de metàstasi. Així doncs l'estudi aïllat de només dos microsatèl·lits (*D9S171* i *D9S161*) pot ser una tècnica, encara que menys sensible, útil en la valoració pronòstica dels pacients de melanoma amb unes despeses molt inferiors a les de l'estudi d'una bateria de 16 microsatèl·lits. De tota manera, aquest ha estat el primer pas per estudis posteriors on s'intenta obtenir una sensibilitat i una especificitat similar utilitzant tècniques menys costoses, més fàcils de realitzar i a poder ser que puguin realitzar-se en mostres en parafina (immunohistoquímica, hibridació *in situ*,...).

Melanoma familiar

De la mostra

En el primer treball dels casos familiars s'ha estudiat una família amb una alta incidència de neoplàsies (2 neoplàsies de pulmó, 1 de laringe, 1 mama, 2 de cèrvix, 4 melanomes i un cas de metàstasis d'origen no filiat). El cas índex d'aquesta família era un pacient de 35 anys que va presentar dos melanomes sincrònics associats a la presència d'un gran nombre de nevus i de nevus clínicament i histològicament atípics (síndrome del nevus clínicament atípic). L'estudi clínic posterior dels diferents membres de la família va permetre identificar 8 pacients més amb SNCA. Per a fer el diagnòstic de SNCA els pacients havien de presentar lesions sospitoses clínicament o amb microscòpia d'epiluminiscència i confirmades histològicament. El diagnòstic histològic requeria la presència de dos criteris majors: presència d'hiperplàsia melanocítica lentiginosa i presència d'atípia cel·lular; i alguns dels criteris menors: fibrosi lamel·lar o eosinofílica concèntrica, fusió de processos interpapil·lars, infiltrat inflamatori, neovascularització. La presència de SNCA en una esposa no consanguínia ens dóna idea de la incidència superior d'aquesta síndrome a la nostra població.

Dels resultats obtinguts:

Lligament de *CDKN2A* a melanoma

L'anàlisi de lligament genètic realitzat per melanoma en 9 famílies dóna un Lod Score intermedi no informatiu que no permetria assegurar que aquest és el locus del melanoma. Això ve donat per què la penetració de la malaltia no és del 100% en els joves. De fet es va considerar una penetració del 50% independentment de l'edat per fer les anàlisis en un dels models i en l'altre vàrem considerar només els afectes per tal d'evitar incloure com a sans persones que al llarg de la seva vida encara poden desenvolupar malaltia. És aquest segon model el que ens va donar un Lod Score superior. De fet es pensa que la penetració de les mutacions de *CDKN2A* per desenvolupar melanoma pot arribar a ser de més del 80% al llarg de tota la vida. En una de les famílies estudiades s'exclou *CDKN2A* com a gen responsable del melanoma en aquesta família.

Identificació d'una mutació de canvi de pauta de lectura a l'exó 2 de *CDKN2A*, 358delG, en una família afectada de FAMMM

Aquesta ha estat la primera família a Catalunya i Espanya on s'ha identificat el mecanisme molecular responsable de susceptibilitat a patir melanoma. És a l'hora la primera família espanyola amb una mutació a *CDKN2A*. Es tracta d'una deleció d'una base a l'exó 2 de *CDKN2A* (358delG) que causa un canvi en la pauta de lectura i un codó d'aturada prematur al codó 145. La proteïna resultant d'aquesta mutació resultaria 11 aminoàcids més curta i amb 26 aminoàcids diferents. Donat que els estudis funcionals realitzats amb la proteïna que té una valina del codó 126 substituïda per àcid aspàrtic, resultant de la mutació T337A, presenta una pèrdua d'afinitat per unir-se a CDK4 i una carència absoluta en la capacitat d'inhibir l'activitat quinasa del complex CDK4/ciclina D, cal pensar que la proteïna truncada fruit de la mutació 358delG, que canvia 25 aminoàcid a més de l'esmentada valina, difícilment pot ser funcional.

Associació de la mutació 358delG de *CDKN2A* a melanoma

Els 4 pacients afectes de melanoma de la família són portadors de la mutació donant suport a la hipòtesi que la mutació 358delG és la responsable de tenir susceptibilitat a patir melanoma en aquesta família. Cal destacar que un dels casos de melanoma es va diagnosticar en un dels controls efectuats en els membres de la família i es va tractar d'un melanoma *in situ*. Això demostra la utilitat del diagnòstic presimptomàtic (de portadors que encara no han desenvolupat malaltia) i dels controls clínics realitzats periòdicament en aquests malalts per dermatòlegs experts en lesions pigmentàries utilitzant la microscòpia d'epiluminiscència com a suport en el diagnòstic.

Identificació de 5 mutacions de canvi de sentit a l'exó 2 de *CDKN2A* en casos familiars de melanoma

Les altres 5 mutacions identificades en les famílies afectes de melanoma estudiades són mutacions *missense*, canvi de sentit, on un aminoàcid és substituït per un altre.

Només una mutació ha estat identificada en dues famílies diferents, la G101T. Aquesta mutació és present en tots els membres afectes de melanoma de les dues famílies estudiades. Aquesta mutació ja havia estat identificada diverses vegades en melanoma familiar. A Itàlia, on s'han identificat 16 famílies afectes de melanoma, portador d'aquesta mutació, hi ha un efecte fundador amb un avantpassat comú en 8 de les famílies. L'anàlisi de l'haplotip de les nostres dues famílies mostra uns al·lels diferents als prèviament descrits per als 3 microsatèl·lits, però comparteixen el mateix al·lel per *D9S162*. Aquest resultat suggereix la hipòtesi que pot existir un efecte fundador a Europa (probablement Itàlia) per aquesta mutació amb possibles reordenaments posteriors, encara que no pot descartar-se que es tracti d'un punt calent mutacional (hot spot). A nivell molecular, aquesta mutació comporta un defecte molt sever, perdent completament la proteïna mutant la capacitat d'inhibir el complex ciclina D1/CDK4.

Una altra mutació prèviament descrita en melanoma familiar és la V59G, present en un pacient afecte de MM i NCA. No disposem d'estudis funcionals de la proteïna mutada però donat que aquesta mutació afecta el segon "ankyrin repeat", domini altament conservat en les proteïnes de la família INK4, i que funcionalment estableix unions amb d'altres proteïnes, pot considerar-se altament sospitosa de ser responsable de susceptibilitat a patir melanoma.

Les altres dues mutacions identificades, D84Y i R87W, no han estat prèviament identificades, però ambdues afecten el tercer "ankyrin repeat". Donat que d'altres mutacions *missense* que afecten aquesta zona, han demostrat codificar proteïnes que perden la seva funció d'inhibició del complex de les ciclines, és probable que les proteïnes mutants codificades per aquestes dues mutacions tampoc siguin funcionals.

Mutacions a *CDKN2A* i melanoma múltiple

En 3 de les famílies on s'han identificat mutacions a *CDKN2A* hi ha pacients amb més d'un melanoma primari. Així doncs, la presència de melanoma múltiple en una família ens ha de fer sospitar una més alta probabilitat d'identificar mutacions a *CDKN2A* (43% de les famílies estudiades amb algun cas de melanoma múltiple, són portadores de mutacions a *CDKN2A*). En dos dels 3 casos la història familiar s'ha conegut després d'identificar la mutació. Així doncs, encara que en els 5 casos sense història familiar coneguda de melanoma no s'ha identificat cap mutació a *CDKN2A*, cal estudiar tots els casos de melanoma múltiple doncs, la història familiar pot desenvolupar-se més endavant. També caldria visitar exhaustivament tots els familiars d'un pacient amb melanoma múltiple per tal d'identificar d'altres membres afectes de melanoma i poder realitzar un diagnòstic precoç.

Característiques de les famílies amb mutacions a *CDKN2A*.

Probabilitat d'identificar mutacions a *CDKN2A* depenent del fenotip

Només un 17% de les famílies estudiades són portadores de mutacions a *CDKN2A*. Aquest percentatge és baix donat que hem estudiat famílies amb pocs casos de melanoma. Quan considerem les famílies amb 3 o més casos

de melanoma, el 33.3% (3 de 9 famílies) són portadores de mutacions a *CDKN2A*. El percentatge de famílies amb mutacions baixa quan baixa el nombre de melanomes a la família (13% de les famílies amb 2 casos i 10% de les famílies amb 1 cas associat a d'altres membres amb NCA). Com hem vist prèviament, el percentatge és superior quan hi ha algun cas de melanoma múltiple a la família pujant el percentatge fins a un 43%. Així doncs, encara que la probabilitat d'identificar mutacions és molt superior en les famílies amb pacients amb més d'un melanoma o bé en les famílies amb 3 o més casos de melanoma, creiem que cal estudiar tots els casos familiars doncs com a mínim podrem identificar la mutació responsable de susceptibilitat en un 10% de les famílies i això ens ha de permetre identificar portadors asimptomàtics (diagnòstic presimptomàtic) i realitzar un adequat seguiment que permeti el diagnòstic precoç del melanoma.

CDKN2A i la SNCA

En la majoria de famílies estudiades on s'han identificat mutacions a *CDKN2A* hi està present la síndrome del nevus clínicament atípic, però curiosament aquesta síndrome en molts casos no ve associada a les mutacions de *CDKN2A*. De fet, en la família BK20 (àmpliament descrita a l'article 3 de la Tesi), hi ha 8 membres Consanguinis afectes de SNCA, però només 2 d'ells són portadors de la mutació 358delG. Com es pot preveure per aquests resultats, l'anàlisi de lligament per la SNCA exclou *CDKN2A* en aquesta família. En la resta de famílies estudiades portadores de mutacions a *CDKN2A*, el fenotip de NCA no se segrega juntament amb les mutacions, mentre que sí ho fa el melanoma. En 4 de les famílies s'exclou el locus de 9p21 com a regió candidata a contenir el gen del melanoma/NCA amb un Lod Score de -22.696 . D'aquestes dades es desprèn que la síndrome del NCA associada a melanoma és una síndrome complexa on el NCA deu heretar-se per d'altres gens de moment no coneguts. En les famílies portadores de mutacions a *CDKN2A*, el ser portadors de la mutació està més associat a melanoma que el ser portador de NCA.

Lligament de *D9S171* i *SNCA*

En la família BK20, les anàlisis de lligament genètic exclouen *CDKN2A* com a locus de la *SNCA*, però alhora, donen un Lod Score prou elevat (1.23), tenint en compte el nombre de membres estudiats, a *D9S171*. Aquests fets poden suggerir l'existència d'altres gens diferents de *CDKN2A* a 9p21 responsables de la *SNCA*.

Els portadors de la mutació 358delG tenen un risc superior de patir d'altres neoplàsies comunes

Ja era ben coneguda l'associació de diverses neoplàsies en les famílies afectes de melanoma familiar, però només s'havia demostrat una alta incidència, estadísticament significativa, d'adenocarcinoma pancreàtic en famílies portadores de mutacions a *CDKN2A*. La família BK20, portadora de la mutació 358delG a *CDKN2A*, té una alta incidència de neoplàsies comunes (neoplàsia de pulmó, de mama i de laringe) associada a la mutació. Aquestes dades cal tenir-les molt en compte alhora de controlar els casos de melanoma familiar per realitzar prevenció primària (evitar carcinògens tals com la radiació U.V., tabac, etc.) i diagnòstic precoç (controls mitjançant microscòpia d'epiluminiscència digital, marcadors tumorals, controls ginecològics, controls oftalmològics, etc.).

No identificació de la segona mutació somàtica a *CDKN2A* en tumors

No vàrem identificar la segona mutació a *CDKN2A* en els quatre tumors estudiats del cas índex, tal i com cal esperar si aquest gen actua com a gen supressor de tumors. La no identificació de la segona mutació pot venir donada per: 1) tractar-se d'una pèrdua d'heterozigocitat que no es pot fer evident per la contaminació amb cèl·lules sanes; 2) la no expressió del segon al·lel pot venir donada per d'altres mecanismes i no ser una mutació puntual o deleció (p.e. metilació de l'illa CpG de *CDKN2A*); 3) tractar-se d'una mutació ubicada a una zona no codificant del gen que afecti el promotor o l'splicing.

Absència de mutacions a p19arf i CDK4 en melanoma familiar

En els casos estudiats no hem identificat mutacions en aquests dos gens, però donat el baix percentatge de mutacions identificada en els casos de melanoma en CDK4, i que només s'ha estudiat una regió del gen (l'exó 2 que codifica per un domini que interacciona amb p16) creiem que cal estudiar més casos i la totalitat del gen per tal d'esbrinar el paper de *CDK4* en el melanoma familiar en el nostre àmbit.

Conclusions

1. Hi ha com a mínim un gen que es troba a 9p21, diferent de *CDKN2A*, que participa en el desenvolupament inicial del melanoma.
2. *CDKN2A* pot estar implicat en el desenvolupament de melanoma esporàdic, però en una proporció menor a la trobada als estudis en línies cel·lulars de melanoma.
3. Hi ha diversos gens a 9p13-23 que participen en l'evolució i progressió del melanoma. Gens diferents de *CDKN2A*, *CDKN2B* i *p19arf*, ubicats al braç curt del cromosoma 9, estan implicats en la progressió tumoral del melanoma.
4. El coneixement de les alteracions moleculars del melanoma primari pot ser útil per a predir l'evolució clínica que tindrà el pacient.
5. Les pèrdues d'heterozigositat de 8 o més marcadors del braç curt del cromosoma 9 determinades en tumors primaris són un índex molt sensible (100%) i específic (84% IC 63.9-99.5) per a predir el desenvolupament de metàstasi en pacients de melanoma en un període de 4,4 a 6,3 anys.
6. Les pèrdues d'heterocigositat de *D9S171* i *D9S161* determinades en tumors primaris són un índex específic (86.7 IC 59.5-98.3 i 82.4 IC 56.6-96.2) encara que menys sensible (87.5 IC 47.3-99.7 i 80.0 IC 28.3-99.5) per a predir el desenvolupament de metàstasis en pacients amb melanoma en un període de 4,4 a 6,3 anys.
7. Mutacions al gen *CDKN2A* són responsables d'una proporció valorable de famílies amb melanoma familiar (17%) en el nostre àmbit.
8. La mutació 358delG al gen *CDKN2A* no és responsable del fenotip de la síndrome de nevus clínicament atípics en les famílies estudiades.
9. La mutació 358delG al gen *CDKN2A* és responsable d'un risc superior de patir d'altres neoplàsies (neoplàsia de mama i de pulmó) en una família amb melanoma i nevus clínicament atípics.
10. La probabilitat d'identificar mutacions a *CDKN2A* augmenta amb l'increment de nombre de casos de melanoma en la família i amb la

presència de membres amb melanoma múltiple dins de la família encara que les famílies amb NCA associat a un cas de melanoma també poden ser portadores de mutacions a *CDKN2A*.

11. La susceptibilitat a patir melanoma i la síndrome de nevus clínicament atípics semblen venir determinades per diferents gens, indicant que probablement la síndrome de nevus clínicament atípics i el melanoma són unes malalties complexes on la interacció de diferents gens determina el fenotip final de l'individu.
12. La identificació de portadors sans de mutacions a *CDKN2A*, diagnòstic presimptomàtic, ha permès diagnosticar precoçment el melanoma (així com en un futur d'altres neoplàsies) permetent disminuir la morbimortalitat produïda per càncer, i especialment per melanoma, en aquestes famílies.

Bibliografia

1. Parkin DM, Pisani P., Ferlay J. Estimates for the world wide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594-606.
2. Devesa SS, Blot WJ, Stone BJ, Miller BA, Tarone RE, Fraumeni JF Jr. Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 175-182.
3. Prorok PC, Hankey B, Bundy B. Concepts and problems in the evaluation of screening programmes. *J Chronic Dis* 1981; 34: 159-71.
4. Spratt JS. Epidemiology of screening of cancer. *Cancer* 1982; 6: 1-58.
5. Kopf AW, Rigel DS, Friedman RJ. The rising incidence and mortality rates of malignant melanoma. *J. Dermatol Surg Oncol* 1982; 8: 760-1.
6. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf A.W. The incidence of malignant melanoma in the United States: Issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 839-47.
7. Van der Esch EP, Muir CS, Nectoux J. Temporal change in diagnostic criteria as a cause of the increase of malignant melanoma over time is unlikely. *Int J Cancer* 1991; 47: 483-90.
8. Nagy K. New database allows researchers to evaluate cancer care costs. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:351-3.
9. Grin CS, Rigel DS, Friedman. Worldwide incidence of malignant melanoma. In Balch CM, Houghton A, Milton G, et al, eds. Cutaneous melanoma. Philadelphia: JB Lippincott.
10. Schreiber MM, Bozzo PD, Moon TE. Malignant melanoma in southern Arizona: increasing incidence and sunlight as an etiologic factor. *Arch Dermatol* 1981; 117: 6-11.
11. Jelfs PL, Coates M, Giles G et al. Cancer in Australia 1989-1990 (with projections to 1995). Cancer series No.5. Australian institute of Health and Welfare and Australasian Associations of cancer Registries, Canberra.
12. Parker SL, Tong T T, Bolden S et al. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J clin* 1996; 46: 5-27.
13. Devesa SS, Silverman BT, Young UL, et al. Cancer incidence and mortality trends among whites in the U.S. 1947-84. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 701-77.

14. MacKie RM. The epidemiology of melanoma in the West. *Melanoma Res* 1997; 7(1): S1.
15. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J, editores, Cancer incidence in five continents, Vol VI Lyon:IARC Scientific Publication 1992, 120.
16. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, editores. Cancer incidence in five continents, Vol.VII. Lyon IARC Scientific Publication 1997, 143.
17. Yamamoto A. The epidemiology of melanoma in the East. *Melanoma Res* 1997; 7(1): S1.
18. Herd RM, Cooper EJ, Hunter JA, et al. Cutaneous malignant melanoma. Publicity, screening clinics and survival the Edinburg experience. *Br J Dermatol* 1995; 132: 563-70.
19. Burton RC. Coates MS, Hersey P, et al. An analysis of a melanoma epidemic. *Int J Cancer* 1993; 55: 765-70.
20. Setlow Rb and Woodhead AD. Temporal changes in the incidence of malignant melanoma: explanation from action spectra. *Mut Res* 1994; 307: 365-374.
21. Husain Z, Pathak MA, Flotte T et al. Role of ultraviolet radiation in the induction of melanocytic tumors in hairless mice following 7,12-dimethylbenz(a)anthracene application and ultraviolet radiation. *Cancer Res* 1991; 51: 4964-4970.
22. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum: cutaneous, ocular and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 1987; 123: 241-250.
23. Stierner U, Augustsson A, Rosdahl I, Suurkula M. Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma in site and sun exposure: a case-control study. *Melanoma Res* 1992; 367-375.
24. Elder DE. Human melanocytic neoplasm and their etiologic relationship with sunlight. *J Invest Dermatol* 1989; 92 (suppl): 297S-303S.
25. Shaart FM, Garbe C, Orfanos C. Disappearance of the ozone layer and skin cancer: attempt at risk assessment. *Hautarzt* 1993; 44: 63-8.

26. Rodenas JM, Delgado-Rodríguez M, Herranz MT, Tercedor J, Serrano S. Sun exposure, pigmentary traits and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 275-283.
27. Hospital La Paz. Memoria 1991. Madrid: INSALUD, Consejería de Sanidad, CAM, 1992; 10-17.
28. Autier P, Doré JF, Schiffers E. Melanoma and use of sunscreens: an EORTC case-control study in Germany, Belgium and France. *Int J Cancer* 1995; 61: 749-755.
29. Elwood JM, Gallagher RP, Davidson J, Hill BG. Sunburn, suntan and the risk of cutaneous malignant melanoma: the Western Canada melanoma Study. *Br J Cancer* 1985; 51: 543-549.
30. Holman CD, Armstrong BK, Heenan PJ. Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 403-414.
31. Holman CD, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun. An analysis separating histogenetic types. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 75-82.
32. Westerdahl J, Olsson H, Masback A et al. Use of sunbeds or sunlamps and malignant melanoma in southern Sweden. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 691-699.
33. Elder DE. Skin cancer: melanoma and other non melanoma skin cancers. *Cancer* 1995; 75: 245-256.
34. Garbe C, Buttner P, Weib J, et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 695-699.
35. Weiss J, Garbe C, Bertz J, et al. Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome in der Bundesrepublik Deutschland: Ergebnisse einer multizentrischen Fall-kontroll-Studie. *Hautarzt* 1990; 41: 309-313.
36. Osterlind A. Epidemiology of malignant melanoma in Europe. *Acta Oncol* 1992; 31: 903-908.

37. Weinstock MA, Colditz GA, Willet WC, et al. Melanoma and the sun: the effect of swimsuits and a "healthy" tan of the risk of nonfamilial malignant melanoma in women. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 462-470.
38. Legha SS, Ring S, Bedikian A et al. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleulin-2 and interferon alfa. *Annals of Oncology* 1996; 7: 827-835.
39. Legha SS, Ring S, Eton O et al. Development and Results of Biochemotherapy in Metastatic Melanoma: The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center Experience. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: S9-S15.
40. Cochran AJ and Heenan P. The classification of melanoma: time for a further revision? *Mel Res* 1997; 7: 4-9,
41. Ackerman AB, Cavegn BM, Abad-Casintahan, Robinson RJ: Resolving quandaries in Dermatology, Pathology and Dermatopathology. Baltimore, Maryland: Promethean Medical Press, Williams and Wilkins. 1995: 169.
42. Marghoob AA, Schoenbac SP, Kopf AW, Orlow SJ,, Nossa R, Bart RS. Large Congenital Melanocytic Nevi and the Risk for the Development of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1996; 132: 170-175.
43. Swerdlow J., English JSC, Qiao Z. The risk of melanoma in patients with congenital nevi. A cohort study. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 595-599.
44. Holman CD, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating hystogenic types, *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 75-82.
45. Fritschi L, McHenry P, Green A. Naevi in schoolchildren in Scotland and Australia. *Br J Dermatol* 1994; 130: 599-603.
46. Weiss J, Garbe C, Bertz J, et al. Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome in der Bundesrepublik Deutschland: Ergebnisse einer multizentrischen Fall-Kontroll-Studie. *Hautarzt* 1990; 41: 309-313.
47. Swerdlow AJ, English J, Mackie RM, et al. Benign melanocytic nevi as a risk factor for malignant melanoma. *BMJ*. 1986; 296: 1555-1559.

48. Garbe C, Buttner P, Weib J, et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 695-699.
49. Clark WH, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanoma from heritable melanocytic lesions. *Arch Dermatol* 1978; 144: 732-738.
50. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin* 1985; 35: 130-51.
51. Consensus Development Panel on early melanoma. Diagnosis and treatment of early melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1992; 268: 1314-9.
52. Slade J, Marghoob A.A, Salopek T.G, Dorell S, Rigel A, Kopf, Bart R.S. Atypical mole syndrome: Risk factor for cutaneous malignant melanoma and implications for management. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 479-94.
53. Augustsson A, Stiener U, Rosdahl I, et al. Common and dysplastic naevi as risk factors for cutaneous malignant melanoma in a Swedish population. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1991; 71: 518-24.
54. Kraemer KH, Greene MH, Tarone R et al. Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. *Lancet* 1983; 2: 1076-7.
55. Rigel DS, Rivers JK, Friedman RJ, et al. Risk gradient for malignant melanoma with dysplastic nevi. *Lancet* 1988; 1352-3.
56. Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, et al. Risk of melanoma and other cancers in melanoma-prone families. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 350S-5S.
57. Grin C.M, Kopf A.W., Welkovich B. Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1990; 126: 763-766.
58. Wolf I.H, Smolle J, Soyer P, Kerl H. Sensitivity in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Melanoma Res* 1998; 8: 425-429.
59. Bahmer F.A, Fritsch P, Kreuzsch J, Pehamberger H, Rohrer Ch, Schindera I, Smolle J, Soyer P, Stoltz W. Terminology in surface microscopy. *J Am Acad Dermatol* 1990 (23); 6: 1159-1162.

60. Stoltz W, Riemann A, Cognetta A. By cols. ABCD rule of dermatoscopy: anew practical method for early recognition of malignant melanoma. *Eur J Dermatol* 1994; 4: 521-7.
61. Binder M, Puespoeck-Schwartz M, Steiner A y cols. Epiluminiscence microscopy of small pigmented skin lesions: Short term formal training improves the diagnostic performance of dermatologists. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 197-202.
62. Sober A.J., Fitzpatrick TB, Mihm MC, et al. Early recognition of cutaneous melanoma. *J Am Dermatol* 1979; 242: 2795-9.
63. Balch CM. Milton G eds. Cutaneous melanoma: clinical management and treatment results world wide. Philadelphia. J.B. Lippincott, 1985.
64. Krementz ET, Reed RJ, Coleman WP III, Sutherland CM, Carter RD, Campbell M. Acral lentiginous melanoma: a clinicopathological entity. *Ann Surg* 1982; 195: 632-45.
65. Morton DL, Wen DR, Wong JH et al. Tecnical details for intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392-9.
66. Morton DL, Wen DR, Foshag LJ, et al. Intraoperative lymphatic mapping and selective sentinel lymphadenectomy for early stage melanomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1751-6.
67. Vidal S, piulachs J, Pons F, Castel T, Palou J, Herranz R. Deteccion del ganglio centinela mediante linfogammagrafía y sonda detectora intraoperatoria en pacientes con melanoma maligno. *Med Clin* 1999; 112: 681-684 .
68. Gritters LS, Francis IR, Zazadny KR. Initial assesment of positron emission tomography using 2-fluorine-18-fluoro-2-deoxy-d-glucose in the imaging of malignant melanoma. *J Nucl Med* 1993; 34: 1420-7.
69. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Meyers M. American Joint Committee on Cancer manual for staging cancer. Philadelphia: JB.Lippicott,1988.
70. Malignant melanoma of the skin(excluding eyelid). En Handbook for staging of cancer. Manual for staging of cancer. 4th. Philadelphia: American Joint Comittee on Cancer; J.B. Lippincott Company, 1993: 155-160.

71. Buzaid Ac, Ross MI, Balch CM, Soong S, McCarthy WH, Tinoco L et al. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal for a new staging system. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1039-51.
72. Day CL,Jr, Mihm CR Jr, Lew RA, Kopf AW, Sober AJ, Fitzpatrick TB. Cutaneous malignant melanoma: prognostic guidelines for physicians and patients. *CA* 1982; 32: 113-22.
73. Thorn M, Adami HO, Ringborg U, Bergstrom R, Krusemo U. The association between anatomic site and survival in malignant melanoma: an analysis of 12.353 cases from the Swedish Cancer Registry. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25: 483-91.
74. Day CL, Sober AJ, Kopf AW y cols. A prognostic model for clinical stage I melanoma of the upper extremity: the importance of the anatomic subsites for predicting recurrent disease. *Ann Surg* 1981; 193: 436-40.
75. Thorn M, Ponten F, Berstrom R, et al. Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population based study in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 761-9.
76. Balch CM, Soong SJ, Shaw Hm. An analysis of prognostic factors in 8500 patients with cutaneous melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, et al. Eds. *Cutaneous melanoma*. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1992; 165-87.
77. Urist MM, Balch CM, Soong SJ, et al. Head and Neck melanoma in 536 clinical stage I patients: a prognostic factors analysis and results of surgical treatment. *Ann Surg* 1984; 200: 769-75.
78. McCarthy W.H, Shaw H.M. The surgical treatment of primary melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1998; (2) 4: 793-799.
79. Austin PF, Cruse Cw, Lyman G, et al: Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population, *An Surg Oncol* 1994; 1: 487-494,.
80. Balch CM, Soong S, Shaw HM, et al; An analysis of prognostic factors in 8.500 patients with cutaneous melanoma. In Balch C (ed): *Cutaneous Melanoma*, ed 2. Philadelphia, JB Lippincott, 1992, pp 165-187.

81. McGovern VJ, Shaw Hm, milton GW, et al. Is malignant melanoma arising in a utchinson's melanotic frekle a separate disease entity? *Histopathology* 1980; 4: 235-42.
82. Ames FC, Balch CM, Reintgen D. Local recurrences and their managment. In: Balch CM, Houghton AM, Milton GW, y cols, eds. *Cutaneous melanoma*. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippicott, 1992; 287-94.
83. Clark W Jr, Elder DE, Guerry D IV, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893.
84. Kelly JW, Sagebiel RW, Clyman S et al. Thin level IV malignant melanoma-subset in which level is the major prognostic indicator. *Ann Surg* 1985; **202**: 98-103.
85. Breslow A. Thickness, cross sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann surg* 1970; 172: 902-8.
86. Bagley FH, Cady B, Lee A, Legg MA. Changes in clinical presentation and manegement of malignant melanoma. *Cancer* 1981; **47**: 2126-2134.
87. Mascaró J, Molgo M, Castel T, Castro J. Plasma cells within the infiltrate of primary cutaneous malignant melanoma of the skin: a confirmation of its histoprognostic value, *AM J Dermatopathol* 1987; 9: 497-499.
88. Ries LA, Hankey BF, Miller BA, et al. Cancer statistics review. 1973-1988. Washington, DC: National Cancer Institute: Us Government Printing Office, 1991: NIH publication No.91-2789.
89. Hacene K, Le Doussal V, Brunet M, et al. Prognostic index for clinical stage I cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 1983; 43: 2991-6.
90. Day CI, Sober AJ, Kopf AW, et al. A prognostic model for clinical stage I melanoma of the trunk: location nera disease. *AM J Surg* 1981; 142: 247-51.
91. Barnhill R, Frandey K, Kang S, Hyman B. Tumor vascularity as a pronostic factor in cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 887-889.

92. Soondergaard K, Schou G: Survival with primary cutaneous malignant melanoma, evaluated from 2012 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 406: 179-195.
93. Czanetzki BM, Denter M, Broker EB, et al. Clinical features of superficial spreading melanomas with zones of regression. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 107: 225-228.
94. Vollmer Rt: Malignant melanoma. A multivariate analysis of prognostic factors. *Pathol Annu* 1989; 24: 383-407.
95. Ronan SG, Eng AM, Briele Ha, et al. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol* 1987; 123: 1326-1330.
96. Slominski A, Ross J, Mihm Mc: Cutaneous melanoma: Pathology, relevant prognostic indicators and progression. *Br Med Bull* 1995; 51: 548-569.
97. Böhn M, Möller P, Kalbfleisch U, Czarnezki M, Schadendorf D. Interleukin-7 induces lymphokine-activated killer cell activity against allogenic and autologous melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 590
98. Yoneda K, Mori Sh. Interleukin 1 β and TNF α increase lymphocyte and neutrophil chemotactic activity of human melanoma cells culture supernatants. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 437.
99. Moretti S, Martini L, Pinzi C, Cecca E, Ganotti B, Berti E. Pattern of integrin expression changes in human benign vs malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 369-374.
100. Bachelier H, Flageul B, Degos L, Bounsell L, Beusessan D, TCR γ bearing T lymphocytes infiltrating human primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 369-374.
101. Kheir SA, Bines Sd, Vonroenn JH, et al. Prognostic significance of DNA aneuploidy in stage I cutaneous melanoma. *Ann surg* 1988; 207: 455-61.
102. Mellado B, Colomer D, Castel T y cols. Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: association with clinical stage and prognosis. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2.091-2.097.

103. Bei guo H, Stoffel-Wagner B, Bierwith T, y cols. Clinical significance of serum S 100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1995; 3: 924-928.
104. Schoultz E, Hansson L.O, Djureen E y cols. Prognostic value of serum analyses of S-100 beta protein in malignant melanoma. *Melanoma Res* 1996; 6: 133-137.
105. Kraehn GM, Scharl M, Peter RU Human malignant melanoma. A genetic disease? *Cancer* 1995; 75: 1228-1237.
106. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 340: 1341-1348.
107. Kosary CL, Ries LAG, Miller BA, Hankey BF, Harras A, Edwards BK, eds. SEER cancer statistics review, 1973-1992: tables and graphs. Bethesda, Md.: National Cancer Institute, 1996. (NIH publications n° 96-2789).
108. Gilchrest BA. Aging and skin cancer. In: Gilchrest BA, ed. Skin and aging processes. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1984: 67-81.
109. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: solar and ultraviolet radiation. Vol. 55. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
110. Armstrong BK, Kricger A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 1993; 3: 395-401.
111. Langford IH, Bentham G, McDonald AL. Multi-level modelling of geographically aggregated health data: a case study on malignant melanoma mortality and UV exposure in the European community. *Stat Med* 1998; 17: 41-57.
112. Bentham G, Aase A. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 1132-1138.
113. Marrett LD, King WD, Walter SD, From L. Use of host factors to identify people at high risk for cutaneous malignant melanoma. *CMAJ* 1992; 147: 1764.

114. Berwick M. Epidemiology: current trends, risk factors, and environmental concerns. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, SoongSJ, eds. *Cutaneous Melanoma*. 3rd ed. St. Louis: Quality Medical Publishing, 1998: 551-571.
115. Forty-five years of cancer incidence in Connecticut: 1935-79. National Cancer Institute monograph 70. Washington D.C.: Government Printing Office, March 1986. (NIH publication n° 86-2652).
116. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J, eds. *Cancer incidence in five continents*. Vol 6. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1992.
117. Pollock PM, Pearson JV and Hayward NK. Compilation of somatic mutations of the CDKN2A gene in human cancers: non-random distribution of base substitutions. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15: 77-88.
118. Castellano M, Pollock PM, Walters MK, Sparrow LE, Down LM, Gabrielli BG, Parsons PG, Hayward NK. CDKN2A/p16 Is Inactivated in Most melanoma cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 4868-4875.
119. Karp JE and Broder S. Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nature Med* 1995; 1: 309-319.
120. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: A marker of malignant progression. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 285-294.
121. Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner II JW, DePinho RA. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility *in vivo*. *Genes and Development*. 1997; 11: 2822-2834.
122. Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Frye Ch, Eeles R, Orlow I, Lacombe L, Ponce-Castaneda V, Lianes P, Latres E, Skolnick M, Cordon-Cardo C, Kamb A. Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumour suppression. *Am J Pathol* 1995; **146**: 1199-1206.
123. Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *TEG* 1995; 11: 136-140.

124. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; **366**:704-707.
125. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types. *Science* 1994; **264**: 436-440.
126. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclindependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; **368**: 753-756.
127. Ohta M, Nagai H, Shimizu M, Rasio D, Berd D, Mastrangelo M, Singh AD, Shields JA, Shields CL, Croce CM, Huebner K. Rarity of somatic mutations and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDKI4, in melanoma. *Cancer Res* 1994; **54**:5269-5272.
128. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. Germline *p16* mutations in familial melanoma. *Nature Genetics* 1994; **8**: 15-21.
129. Kamb A, Shattuck-Eidens, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick NH, Cannon-Albright LA. Analysis of the *p16* gene (*CDKN2*) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genetics* 1994; **8**: 22-26.
130. Karp JE, Broder S. Molecular foundations of cancer: New targets for intervention. *Nature Medicin* 1995; 1: 309-319.
131. Petty EM, Gibson LH, Fountain JW, Bologna JL, Yang-Feng TL, Housman DE, Bale AE. Molecular definition of a chromosome 9p21 germ-line deletion in a woman with multiple melanomas and a plexiform neurofibroma: Implications for 9p Tumor-Suppressor gene(s). *Am J Human Genet* 1993; **53**: 96-104.
132. Balaban G, Herlyn M, Clark WH, Nowell PC. Karyotypic evolution in human malignant melanoma. *Cancer Genet Citogenet* 1986; **19**: 113-122.

133. Cowan JM, Halaban R, Francke U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1159-1164.
134. Grammatico P, LoRe ML, Scarpa S, Modesti A, Del Porto G. Human Malignant Melanoma: significance of chromosomal abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 48: 237-242.
135. Pedersen MI, Wang N. Chromosomal evolution in the progression and metastasis of human malignant melanoma: a multiple lesion study. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 41: 185-201.
136. Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN, Lahti J, Kidd VJ, Housman DE, Dracopoli NC. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**:10557-10561.
137. Walker GJ, Palmer JM, Walters MK, et al. Refined localization of the melanoma (MLM) gene on chromosome 9p by analysis of allelic deletions. *Oncogene* 1994; **9**: 819-824.
138. Weaver-Faldhaus J, Gruis NA, Neuhausen S, et al. Localization of a putative tumour suppressor gene by using homozygous deletions in melanomas. *Proc Natl Sci USA* 1994; **91**: 7563-7567.
139. Olopade OI, Bohlander SK, Pomykala H, Maltepe E, Van Melle E, Le Beau MM, and Diaz MO (1992) Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia. *Genomics* 14:437-443.
140. Lathrop GM and Lalouel JM. Easy calculations of Lod Scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet* 1984; 36 : 460-465
141. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, Olopade OI, Diaz MO, Kwiatkowski DJ, Piepkorn MW, Zone JJ, Skolnick MH Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-22. *Science* 1992; **258** : 1148-1152
142. Isshiki K, Seng BA, Elder DE, Guerry D, and Linnenbach AJ. Chromosome 9 deletion in sporadic and familial melanomas *in vivo*. *Oncogene* 1994; 9: 1649-1653.

143. Nancarrow DJ, Mann GJ, Holland EA, Walker GJ, Beaton SC, Walters MK, Luxford C, Palmer JM, Donald JA, Weber JL, Fountain JW, Kefford RF, Hayward NK. Confirmation of chromosome 9p linkage in familial melanoma. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 936-942.
144. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavgigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb. Complex structure and regulation of the *P16 (MTS1)* locus. *Cancer Research* 1995; 55: 2988-2994.
145. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371 : 257-261.
146. Mao L, Merlo A, Gauri B, Shapiro G.I, Edwards C.D, Rollins B.J, Sidransky D. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Research* 1995; 55: 2995-2997.
147. Quelle D.E, Zindy F, Ashmun R.A, Sherr C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.
148. Quelle D.E, Cheng M, Ashmun R.A, Sherr C.J. Cancer-associated mutations at the *INK4a* locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 1997; 94: 669-673.
149. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavgigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb. Complex structure and regulation of the *P16 (MTS1)* locus. *Cancer Research* 1995; 55: 2988-2994.
150. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, et al. Rates of *p16 (MTS1)* mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994; 265:415-416.
151. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, WeinsteinCL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genet* 1994 ; 8 : 27-32.
152. Hayashi N, Sugimota Y, Tsuchiya E, Ogawa M, Nakamura Y. Somatic mutations of the MTS (multiple tumor suppressor) 1/CDK4I (cyclin-dependent kinase-4 inhibitor) gene in human primary non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 202 : 1426-1430.

153. Healy E, Sikkink S, Rees JL. Infrequent mutation of p16^{INK4} in sporadic melanoma. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 318-321.
154. Lilischkis R, Sarcevic B, Kennedy C, Warlters A, Sutherland RL. Cancer-associated mis-sense and deletion mutations impair p16^{ink4} CDK inhibitory activity. *Int. J. Cancer* 1996; 66: 249-254.
155. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutations of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor / cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3396-3397.
156. Platz A, Ringborg U, Lagerlöf B, Lundqvist E, Sevigny P, Inganäs M. Mutational analysis of the *CDKN2* gene in metastases from patients with cutaneous malignant melanoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 344-348.
157. Ueki K, Rubio MP, Ramesh V, Correa KM, Rutter JL, von Deimling A, Buckler AJ, Gusella JF, Louis DN. MTS1/CDKN2 gene mutations are rare in primary human astrocytomas with allelic loss of chromosome 9p. *Human Mol Genet* 1995 ; 3 : 1841-1845.
158. Zhou X, Tarmin L, Yin J, Jiang HY, Suzuki H, Rhyu MG, Abraham JM, Meltzer SJ. The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors. *Oncogene* 1994 ; 9 : 3737-3741.
159. Komiya A, Suzuki H, Aida S, Yatani R, Shimazaki J. Mutational analysis of the CDKN2 (CDK4I/MTS1) gene in tissues and cell lines of human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86 : 622-625 .
160. Liu Q, Neuhausen S, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Eddington K, Allalunis-Turner MJ, Skolnick MH, Fujimura FK, Kamb A (b) CDKN2 (MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines. *Oncogene* 1995; 10: 1061-1067.
161. Moulton T, Samara G, Chung WY, Yuan L, Desai R, Sisti M, Bruce J, Tycko B. MTS 1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 1995; 146 : 613-619.
162. Uchida T, Watanabe T, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Hotta T. Mutational analysis of the CDKN2 (MTS1/p16^{ink4A}) gene in primary B-cell lymphomas. *Blood* 1995; 86 : 2724-2731.

163. Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Devlin J, Knowles MA. p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 1995; 4 : 1569-1577.
164. Xiao S, Li D, Corson JM, Vijg J, Fletcher JA. Codeletion of p15 and p16 genes in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55 : 2968-2971.
165. Yeudall WA, Crawford RY, Ensley JF, Robbins KC. MTS1/CDK4I is altered in cell lines derived from primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 1994; 15 : 2683-2686.
166. Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y, Hanai S, Suzuki H, Hori M, Fukao K, Miwa M, Uchida K. Mutations of the p16Ink4/CDKN2 and p15Ink4B/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* 1995; 55 : 2756-2760.
167. Zhang SY, Klein-Szanto AJ, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, Carson DA, Ridge JA, Goodrow TL. Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinomas cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res* 1994; 54: 5050-5053.
168. Zhou X, Tarmin L, Yin J, Jiang HY, Suzuki H, Rhyu MG, Abraham JM Meltzer SJ. The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors. *Oncogene* 1994; 9 : 3737-3741.
169. Glendening JM, Flores JF, Walker GJ, Stone S, Albino AP, Fountain JW. Homozygous loss of the p15INK4B gene (and not the p16INK4A gene) during tumor progression in sporadic melanoma patient. *Cancer Res* 1995; 55: 5531-5535.
170. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancer. *Nature Medicine* 1995; 1 : 686-692.
171. Otterson Gregory A, Khleif SN, Chen W, Coxon AB, Kaye FJ. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16^{INK4} protein induction by 5-aza 2' deoxycytidine. *Oncogene* 1995; 11: 1211-1216.

172. Reed JA, Loganzo F, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, Albino AP. Loss of expression of the *p16* /Cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Research* 1995; 55, 2713-2718.
173. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85: 27-37.
174. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19(ARF). *Cell* 1997; 91: 649-659.
175. Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, Bergman W, Frants RR. Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nature Genetics* 1995; 10: 351-353.
176. Clark WH, Reimer RR, Greene M Ainsworth AM and Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. *Arch Dermatol* 1978; 114: 732-738.
177. Lynch HT, Fritchot BC, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978; 15: 352-356.
178. Greene MH and Fraumeni JF Jr (1979) The hereditary variant of malignant melanoma. Grune and Stratton, New York.
179. Lynch HT, Fusaro RM, Kimberling WJ, Lynch JF, Danes BS. Familial atypical multiple mole-melanoma (FAMMM) syndrome : segregation analysis. *J Med Genet* 1983; 20: 342-344.
180. Bale SJ, Draccopoli NC, Tucker MA, Clark WH, Fraser MC, Stanger BZ, Green P, Donis-Keller H, Houssman DE, Green MH. Mapping the gene for hereditary to chromosome 1p. *N Engl J Med* 1989; 320: 1367-1372.
181. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Wright E, et al. Evidence against the reported linkage of the cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus syndrome locus to chromosome 1p36. *Am J Human Genet* 1990; 46: 912-918.

182. Goldstein AM, Dracopoli NC, Ho EC, et al. Further evidence for a locus for cutaneous malignant-melanoma dysplastic nevus (cmm/dn) on chromosome 1p, and evidence for genetic-heterogeneity. *Am J Human Genet* 1993; 52: 537-550.
183. Goldstein AM, Dracopoli NC, Engelstein M, Frase MC, Clark WH, Tucker MA. Linkage of cutaneous malignant melanoma/ dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 54: 489-496.
184. Goldstein AM, Goldin R, Dracopoli NC, Clark Jr. WH, Tucker MA. Two-locus linkage analysis of cutaneous malignant melanoma / dysplastic nevi. *Am J Hum Genet* 1996 ; 58 : 1050-1056.
185. MacGeoch C, Newton Bishop JA, Bataille, et al. Genetic heterogeneity in familial malignant melanoma. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2195-2200.
186. Walker GJ, Hussussian CJ, Flores JF, Glendening JM, Haluska FG, Dracopoli NC, Hayward NK, Fountain JW. Mutations of the CDKN2/p16INK4 gene in australian melanoma kindreds. *Hum Mol Genet* 1995; 4 : 1845-1852.
187. Borg A, Johansson U, Hakansson S, Westerdahl J, Masback A, Olsson H, Ingvar Ch. Novel germline p16 mutation in familial melanoma in Southern Sweden. *Cancer Res* 1996; 56 : 2497-2500.
188. Holland EA, Beaton SC, Becker TM, Grulet OMC, Peters BA, Rizos H, Kefford RF, Mann GJ. Analysis of the p16 gene, CDKN2, in 17 Australian melanoma kindreds. *Oncogene* 1995; 11: 2289-2294.
189. Liu L, Lassam NJ, Slingerland JM, Bailey D, Cole D, Jenkins R, Hogg D. Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma. *Oncogene* 1995; 11: 405-412.
190. Fitzgerald MG, Harkin DP, Silva-Arrieta S, MacDonald DJ, Lucchina LC, Unsal H, O'Neill E, Koh J, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Sober AJ, Haber DA. Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: Analysis of a clinic-based population. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 8541-8545
191. Quelle DE, Cheng M, Ashmun RA, Sherr CJ. Cancer-associated mutations at the *INK4a* locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but

- not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 : 669-673.
192. Harland M, Meloni R, Gruis N, Pinney E, Brookes S, Spurr NK et al. Germline mutations of the CDKN2 gene in UK melanoma families. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2061-2067.
193. Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombléd J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, French FM group. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in melanoma-prone families in France. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 209-216.
194. Ranade K, Hussussian CJ, Sikorski RS, Varmus HE, Goldstein AM, Tucker MA, Serrano M, Hannon GJ, Beach D, Dracopoli NC. Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nature Genet* 1995; 10: 114-116.
195. Raymond A and Brent R. p16 proteins from melanoma-prone families are deficient in binding to CDK4. *Oncogene* 1995; 11: 1173-1178.
196. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N and Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Genet* 1999; 21: 128-132.
197. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of the CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996;12:97-99.
198. Tsao H, Benoit E, Sober AJ, Thiele C, Haluska FG. Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. *Cancer Res* 1998; 58: 109-113.
199. Monzon J, Liu L, Brill H, Goldstein AM, Tucker MA, From L, McLaughlin J, Hogg D, Lassam NJ. Mutations in multiple primary melanomas. *N Engl J Med* 1998; 338: 879-887.
200. Ciotti P, Strigini P and Bianchi-Scarra G. Familial melanoma and pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1996; 334:469-470.
201. Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, Hussussian CJ, Ranade K, Zimetkin DP, Fontaine LS, Organic SM, Dracopoli NC, Clark WH,

- Tucker MA. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16^{INK4} mutations. *N Engl J Med* 1995; 333 : 970-974.
202. Whelan AJ, Bartsch D, Goodfellow PJ. A familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1995; 333: 975-977.
203. Elder DE. Skin cancer. melanoma and other specific nonmelanoma skin cancer. *Cancer* 1995; 75 (suppl) : 245-256.
204. Bergman W, Watson P, de Jong J, Lynch HT, Fusaro RM. Systemic cancer and the FAMMM syndrome. *B J Cancer* 1990; 61: 932-6.
205. Lynch HT and Fusaro RM. Pancreatic cancer and the familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome. *Pancreas* 1991; 6: 127-131.
206. Rizos H, Becker TM, Holland EA, Kefford RF, Mann GJ. Differential expression of p16^{INK4a} and p16^{beta} transcripts in B-lymphoblastoid cells from members of hereditary melanoma families without *CDKN2A* exon mutations. *Oncogene* 1997; 15: 515-523.
207. Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A, Jackson IJ, Rees JL. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MCR1) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1663-1666.

