

PEDECIBA
ÁREA BIOLOGÍA
SUBÁREA GENÉTICA

***IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE REGIONES
CROMOSÓMICAS ASOCIADAS A MELANOMA ESPORÁDICO EN EL
URUGUAY MEDIANTE EL MÉTODO DE MAPEO POR MESTIZAJE:
MCI-R COMO POSIBLE GEN CANDIDATO***

TESIS DE MAESTRÍA
LIC. JIMENA HOCHMANN VALLS

Tribunal

Presidente: Dra. Mónica Sans

Vocal: Dra. Leda Roche

Vocal: Dra. Adriana Mimbacas

Orientador: Dr. Bernardo Bertoni

Montevideo, 20 de Enero 2012

INDICE

| | |
|--|----|
| INDICE | 1 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| RESUMEN | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| • La pigmentación humana y su evolución | 7 |
| • Aspectos históricos del Melanoma | 11 |
| • Aspectos generales del Melanoma Maligno | 12 |
| • Epidemiología del MM | 16 |
| • Factores de riesgo ambientales | 21 |
| • Factores de riesgo genéticos | 25 |
| • Diagnóstico clínico, tratamiento y pronóstico del MM | 28 |
| • Herramientas genéticas para el estudio de enfermedades complejas | 31 |
| OBJETIVOS | 38 |
| • Objetivos generales | 38 |
| • Objetivos específicos | 38 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| • Población de estudio | 39 |
| • Extracción de ADN y elección de los MIAs | 39 |
| • Genotipado de MIAs y MC1-R | 40 |
| • Análisis de MC1-R | 45 |

| | |
|--|----|
| • Análisis estadísticos | 46 |
| <hr/> | |
| RESULTADOS | 48 |
| <hr/> | |
| • Factores de riesgo para el desarrollo del MM | 51 |
| • Ancestralidad en la población uruguaya | 52 |
| • Análisis de la asociación de los MIAs con el riesgo al Melanoma Esporádico | 55 |
| • Asociación del MC1-R y el riesgo al MM | 59 |
| • Análisis de haplotipos del gen MC1-R | 60 |
| • Análisis de la secuencia del MC1-R | 63 |
| <hr/> | |
| DISCUSIÓN | 66 |
| <hr/> | |
| • Factores de riesgo para el desarrollo del MM | 66 |
| • Análisis de los MIAs | 70 |
| • Variantes del MC1-R | 73 |
| <hr/> | |
| CONCLUSIONES | 79 |
| <hr/> | |
| PERSPECTIVAS | 81 |
| <hr/> | |
| BASES ELECTRÓNICAS | 82 |
| <hr/> | |
| BIBLIOGRAFÍA | 83 |
| <hr/> | |
| ANEXO | 95 |
| <hr/> | |
| • Anexo I | 95 |
| • Anexo II | 97 |

- Anexo III

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de maestría ha podido realizarse gracias a la contribución de numerosas personas que han colaborado en su desarrollo:

A mi director de tesis, Dr. Bernardo Bertoni, fuente de motivación e inspiración y gran amigo que me enseñó a valorar entre otras cosas a la Epidemiología Genética. Gracias por tu paciencia y comprensión durante estos 5 años que he estado inmersa en esta fascinante área de investigación en la que me he sentido muy cómoda.

A mi co-orientador el Dr. Miguel Martínez, el cual me ha incentivado en esta línea de investigación del melanoma e hizo que aprendiera tanto de la parte clínica. Gracias por brindarme las muestras de los pacientes porque sin ello este proyecto nunca hubiera sido posible de haberse llevado a cabo.

A Mónica Cappetta por su amistad, voluntad, paciencia, e incondicional ayuda en todo a lo largo de este trabajo. Gracias por siempre verle el lado positivo a las cosas y ayudarme a ser más práctica cuando lo fuese necesario.

A Javiera Perez, por su amistad, buena onda y apoyo incondicional durante la recolección de muestras.

A mis compañeros de “La Isla”; a Valentina por su gran ayuda en el análisis de datos y paciencia, a Tati, Lore y Jorge por su profunda amistad e incondicional apoyo en todo mi trabajo.

A mis compañeros del Departamento de Genética por su gran compañerismo y amistad durante mis cuatro años en el Departamento, en especial a Carlos, Julio, Lucía, Nico y Pablito por brindarme apoyo y alegría de una u otra manera en la realización de mi tesis.


A la Cátedra de Dermatología del Hospital de Clínicas, por la buena onda de brindarme las muestras de los pacientes, ya que sin ellas este trabajo no hubiera podido realizarse.


Al laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Clínicas, principalmente a la Lic. Paola Da Silveira por permitirme reclutar la muestra de controles en el mismo.


A la Dra. Gloria Ribas, por permitirme ir a hacer parte del análisis de mi tesis en su laboratorio en Valencia-España.

Al tribunal de esta tesis por su paciencia y buena voluntad


A la secretaria de PEDECIBA-Biología, Cecilia Rangoni por la buena onda

A la Agencia de Investigación e Innovación (ANII) por ser fuente de financiación de este trabajo de maestría. 

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por ser fuente de financiación de este trabajo. 

A la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (CHLCC) por ser fuente de financiación de este trabajo. 

A la Fundación Manuel Perez perteneciente a la Facultad de Medicina por financiar parte de este trabajo.

Al laboratorio Gramón Bagó por ser parte de la financiación de este proyecto 

A mis amigas de la vida; Majo, Ana, Flor, Xime C, Xime B, por tenerme la paciencia que me han tenido, y por brindarme el apoyo y el ánimo incondicional en esta etapa tan importante en mi vida.

Por último quiero agradecer a mi familia: mamá, papá, Mati y Agus y a mis abuelas, porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible, por la paciencia que me han tenido durante esta etapa y por su continuo apoyo y ánimo para concluir la elaboración de esta tesis.

RESUMEN

El melanoma maligno (MM) cutáneo es el cáncer de piel más peligroso y la principal causa de muerte con respecto a otras enfermedades de la piel. En Uruguay la tasa de incidencia es de 3.8/100.000 habitantes lo cual la hace ser la más alta de Latinoamérica. Esta enfermedad es compleja por lo que tanto factores ambientales como genéticos contribuyen a su etiología. En este trabajo se analizó la contribución de la ancestralidad y la estructura del gen MC1-R en el riesgo al MM en la población uruguaya. Se analizaron 109 individuos control y 100 pacientes afectados por MM para dicho estudio. Dentro de los factores fenotípicos y ambientales se vio que el fototipo, la presencia de nevos atípicos, nevos adquiridos, quemaduras solares en la niñez y exposición al sol recreacional intermitente durante la niñez constituyeron los principales factores de riesgo para el desarrollo del melanoma.

Por otra parte se encontró una relación entre la ancestralidad europea y una región cromosómica del gen MC1-R, lo cual representa un importante aspecto para continuar con el método de Mapeo por Mestizaje en nuestra población.

Se ha detectado una región cromosómica (16q) que confiere susceptibilidad al MM, como región candidata de dicha enfermedad en nuestra población. En la población uruguaya encontramos tres haplotipos nuevos del gen MC1-R en la región promotora, y en la misma detectamos otros dos haplotipos que difieren en sus frecuencias respecto a los europeos del HapMap y de los españoles. Sin embargo, se vio que los haplotipos encontrados para la región codificante del gen revelaron una frecuencia similar a la población de España. Además en este gen encontramos dos mutaciones novedosas en un mismo individuo control. Una de ellas fue un cambio sinónimo (C267C) y la otra fue un cambio no sinónimo denominado P268S. La estructura única de la región cromosómica del gen MC1-R, presente en la población uruguaya, está probablemente asociada al desarrollo del MM más que a mutaciones no sinónimas.

INTRODUCCION

La piel es el órgano que cubre toda la superficie corporal y que actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno. El color de la piel de cada persona está determinado genéticamente y se debe a la acción de dos pigmentos. La melanina de la epidermis y la hemoglobina de los glóbulos rojos que circulan por los vasos sanguíneos situados en la dermis. La melanina es la responsable del color moreno de la piel. De ahí las diferencias de color de una población a otra. La melanina (palabra derivada del griego “melas”, negro) es un pigmento producido exclusivamente por unas células especializadas llamadas melanocitos. En ellos, mediante un proceso de melanogénesis, se elabora la melanina a partir del aminoácido tirosina y se producen dos tipos de melanina: la eumelanina, que es un pigmento negro o marronáceo y la feomelanina, que es un pigmento rojo-amarillento, propio de las personas pelirrojas. En el interior de estas células se acumula la melanina en unos pequeños órganos llamados melanosomas. Por lo que las diferencias que se observan entre las distintas poblaciones se basa en el número, disposición y forma de estos organelos. La menor pigmentación es uno de los rasgos que se asocia a mayor riesgo al melanoma por lo cual según datos epidemiológicos existe una asociación entre el origen de la población y el melanoma; hay una mayor incidencia en las poblaciones de origen europeo con respecto a las poblaciones africanas y/o asiáticas (PARKIN *et al.* 2005).

LA PIGMENTACIÓN HUMANA Y SU EVOLUCIÓN

La pigmentación es uno de los fenotipos más variables en la especie humana. El color de la piel, el cabello y los ojos está determinado principalmente por la melanina. Esta es un complejo de biopolímeros sintetizados por células especializadas conocidas como melanocitos. Dentro de los melanocitos, la producción de melanina se lleva a cabo en

pequeñas partículas denominadas melanosomas (REES 2003). En la piel, los melanosomas son transferidos desde los melanocitos a otras células de la piel denominadas queratinocitos, y estos eventualmente migran a las capas superiores de la epidermis. Dentro de los queratinocitos, los melanosomas se encuentran agregados en torno al núcleo, y proporcionan protección contra los efectos dañinos de los rayos ultravioleta (RUV). En el cabello, los melanocitos también transfieren melanosomas a queratinocitos que a su vez migran y se diferencian para formar el tallo del cabello. En contraste con la piel y el cabello, en el iris los melanosomas se encuentran únicamente dentro de los melanocitos, y el tipo de melanina y la densidad y distribución de los melanosomas son los principales determinantes del color de los ojos (PARRA 2010). La evidencia disponible señala que la selección natural causa la variación observada en la pigmentación, pero los factores evolutivos específicos no han sido completamente dilucidados. Recientemente, ha habido importantes avances acerca del sistema pigmentario, principalmente guiados por estudios en modelos animales, y también por estudios de los desórdenes de la pigmentación en los humanos (PARRA 2010). Las diferencias en pigmentación se deben a dos factores importantes: la cantidad y el tipo de melanina sintetizada en los melanocitos y la forma y la distribución de los melanosomas (ver figura 1). La piel con poca pigmentación es rica en las formas más claras de la melanina (eumelanina café y feomelaninas amarillo/rojo), y los melanosomas tienden a ser menos pigmentados, de menor tamaño y empaquetados en grupos. La piel más oscura tiene más melanina, enriquecida con las formas más oscuras de la melanina. Adicionalmente, los melanosomas de los individuos de piel oscura son más pigmentados, más grandes y distribuidos en unidades aisladas (BARSH 2003).

Africanos Asiáticos Europeos

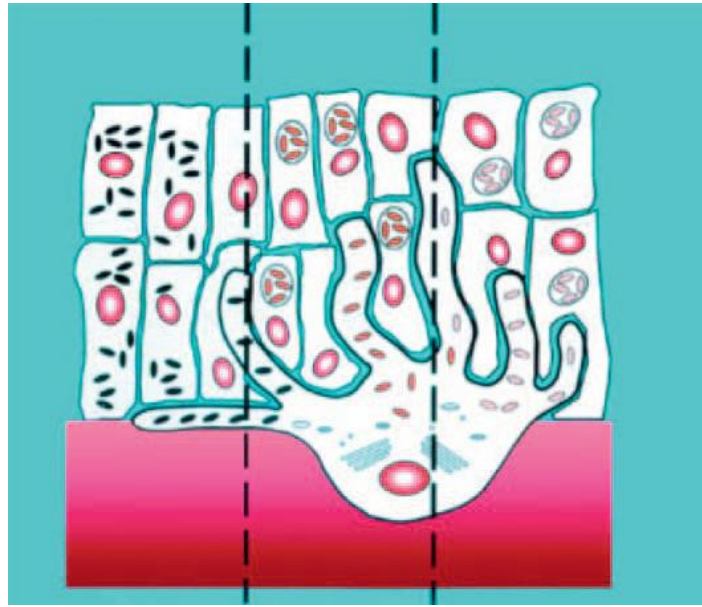


Figura 1. Diferencias poblacionales en los patrones de tamaño y distribución de los melanosomas en la piel.

Tomada de Barsh, 2003, (BARSH 2003).

Se ha visto que existe una fuerte correlación entre la latitud y la pigmentación de la piel y/o radiación UV principalmente para países del Viejo Mundo (Africa, Asia y Europa). Por lo que varios factores selectivos podrían guiar la evolución de piel altamente melanizada en las regiones ecuatoriales y tropicales con alta incidencia de RUV. Numerosas hipótesis se han presentado para explicar la evolución de la pigmentación cutánea en poblaciones humanas, tomando en consideración la relación observada entre los valores de melanina y la latitud. El factor subyacente que podría explicar la distribución geográfica de la pigmentación cutánea en la especie humana es la exposición a la RUV (JABLONSKI and CHAPLIN 2000). Aunque se conocen muchos genes que explican las enfermedades mendelianas asociadas a la pigmentación humana y también la variabilidad del color de los ratones (BENNETT and LAMOREUX 2003), muy pocos se han asociado a la variación normal de la pigmentación de la piel en humanos (BONILLA *et al.* 2005; BOX *et al.* 1997; FLANAGAN *et al.* 2000; GRAF *et al.* 2005; KANETSKY *et al.* 2002; LAMASON *et al.* 2005; SHRIVER *et al.* 2003; SMITH *et al.* 1998). Dentro de los genes candidatos de la pigmentación se encuentran genes que actúan en varias etapas de la vía de la pigmentación desde la melanogénesis, la estabilización y el transporte de enzimas en la producción de melanina, el

cambio de eumelanina y feomelanina y la producción y el mantenimiento de los melanosomas. Entre estos genes se encuentran: TYR, produce la tirosinasa, la cual es una enzima dependiente de cobre, que cataliza los dos primeros pasos durante la melanogénesis. Esta proteína se requiere para la síntesis de ambos tipos de melanina (ANCANS *et al.* 2001; IOZUMI *et al.* 1993). El gen MATP, está involucrado en el tráfico y en el procesamiento intracelular (COSTIN *et al.* 2003), OCA2, es una proteína de membrana del melanosoma encargada de transportar moléculas al melanosoma (SCHERER and KUMAR 2010). SLC24A5, es un transportador de membrana que regula los niveles de calcio durante el desarrollo de los melanosomas (LAMASON *et al.* 2005). Finalmente el gen MC1-R, el cual codifica para el receptor de la melanocortina y el gen ASIP, están ambos involucrados en la producción de dos tipos de melanina, oscura y clara. El gen ASIP inhibe la eumelanogénesis en los melanocitos humanos (SUZUKI *et al.* 1997).

Los estudios genéticos y bioinformáticos indican que la selección natural (y quizás también la selección sexual) ha tenido un papel muy importante en la evolución de la pigmentación. La disponibilidad de datos genéticos de muchos marcadores dispersos por todo el genoma en diferentes poblaciones ha hecho posible identificar regiones del genoma donde hay evidencia clara de la acción de la selección natural (IZAGIRRE *et al.* 2006; MCEVOY *et al.* 2006; MYLES *et al.* 2007).

La selección sexual puede haber influido en la distribución geográfica de la pigmentación tal como antiguamente Charles Darwin mencionó que las diferencias observadas para algunas características humanas, incluyendo la pigmentación, podrían ser el resultado de la selección sexual (DARWIN 1871). De hecho, existe evidencia que indica que la pigmentación es una característica importante para la elección de parejas en los humanos, lo cual condujo a varios autores a postular que efectivamente la selección sexual ha sido un factor importante en la distribución no sólo de la piel, sino también de otras características como el pelo y el color de los ojos (AOKI 2002; JABLONSKI and CHAPLIN 2000).

Como se mencionó anteriormente la pigmentación de la piel constituye una de las características físicas más importantes con consecuencias en la susceptibilidad al cáncer de piel. Muchas de las variantes de los genes que están implicados en la pigmentación se asocian a fenotipos de alto riesgo tales como piel clara, ojos claros y pelo pelirrojo y/o

rubio, por lo que estas variantes son consideradas de alto riesgo para el desarrollo del cáncer de piel. El melanoma maligno (MM) es considerado un problema europeo ya que su mayor incidencia se da en poblaciones de origen europeo por lo que países como Australia, Estados Unidos y Nueva Zelandia, donde la población de origen europeo es la mayoritaria, la incidencia de éste cáncer es muy alta.

ASPECTOS HISTÓRICOS DEL MELANOMA

Existe controversia en cuanto a quien hizo referencia por primera vez en la antigüedad sobre el término melanoma. Varios autores creen que la primera descripción histórica del melanoma fue realizada en un papiro egipcio hace 1500 AC (URTEAGA and PACK 1966). Sin embargo otros autores creen que la primera descripción detallada del melanoma fue la de Hipócrates en 460-375 AC, la cual fue “tumores negros fatales con metástasis” (GARCÍA GUAL 1983).

El primer melanoma del cual realmente se tiene conocimiento fehaciente fue descrito en un paciente operado por John Hunter en 1787 (PRIARIO 2005). A través de la pintura es posible identificar en la familia real española de Carlos IV la presencia de melanoma. En el famoso cuadro de Goya se puede ver a la infanta María Josefina padeciendo de una importante lesión pigmentada de la región lateral derecha de la cara. Por otro lado, en Francia, Rene Theophile Laennec, en memorias presentadas a la Facultad de Medicina de París en 1806, describió una entidad patológica que denominó “la melanose” (melanosis) debido al color negro de la misma. También describió melanosis afectando el hígado, los pulmones y el peritoneo (DENKLER and JOHNSON 1999). En el Uruguay, en 1904, el Dr. Juan Brito Foresti, de la Policlínica de enfermedades de la piel del Hospital de Caridad publicó un trabajo sobre “Sarcomas melánicos de la piel” (BRITO FORESTI 1903). En él se presenta un avanzado melanoma del dorso rodeado de múltiples lesiones satélites. Luego en 1937, H. Suárez y G. Mernies publicaron en el boletín de la Sociedad de Cirugía del

Uruguay (SUAREZ 1937), un caso de melanoma maligno metastásico. Esta es la primera vez que en nuestro medio se usa la definición médica que hoy conocemos.

ASPECTOS GENERALES DEL MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO

El melanoma maligno cutáneo es la proliferación neoplásica maligna originada en los melanocitos de la epidermis. Los melanocitos son las células de la piel responsables de sintetizar la melanina, y por ende son los responsables de la pigmentación de la piel.

El MM se encuentra en dos formas, puede presentarse de forma hereditaria o de forma esporádica. En el cáncer hereditario se transmite el gen mutado a la descendencia de una forma autosómica dominante. En este tipo de cáncer se ve que una persona afectada por melanoma maligno tiene dos o más familiares de primer grado afectados por dicha enfermedad y tiende a ocurrir a una edad más temprana. Un miembro de una familia afectada por MM presentará un riesgo de 35-70 veces más de desarrollar melanoma en comparación con una persona que no presenta historia familiar de dicha enfermedad (LARRE BORGES *et al.* 2009). La susceptibilidad a este tipo de melanoma se debe a genes de alto riesgo y de alta penetrancia (CDKN2A, CDK4). La forma esporádica se refiere a cuando el melanoma maligno surge de una manera espontánea debido a causas ambientales en su mayoría. Por lo que este tipo de cáncer no presenta un patrón de herencia de cáncer en la familia. El 90% de los melanomas son de tipo esporádico, por lo que únicamente el 10% son de tipo familiar. Dentro de los cánceres de piel, el melanoma maligno es menos frecuente que el carcinoma basocelular y espinocelular, pero es de peor pronóstico, este representa 6 de cada 7 muertes por cáncer de piel (LANG 2002). Su tasa de incidencia ha presentado el mayor crecimiento en el mundo (DE VRIES and COEBERGH 2004). Durante los años 70 la tasa de incidencia aumentó en un 6% por año pero luego disminuyó a un 3% desde 1981 al 2000, y desde esa fecha se ha mantenido constante (BRADFORD 2009; PORCIA 2009). En la actualidad el 65-75% de las muertes por cáncer cutáneo se explican por MM, pero solo representan el 4 al 5% del total de las muertes por cáncer en poblaciones de Estados Unidos (SIEGEL *et al.* 2012).

SUBTIPOS DE MELANOMA

El melanoma puede ser dividido en distintos tipos según su localización anatómica, presentación histológica y patrones de crecimiento. Se reconocen cuatro variedades según la *World Health Organization* (WHO) el melanoma extensivo superficial, el melanoma nodular, el melanoma lentigo maligno y el melanoma lentiginoso acral (ver figura 2). El melanoma extensivo superficial, representa el 60-70% de los melanomas en la población europea y está constituido a nivel histológico por melanocitos grandes dispersos en la epidermis. Por otro lado, el melanoma nodular comparte las características histológicas de la fase de crecimiento vertical de un melanoma extensivo superficial. El melanoma lentigo maligno, es de poca agresividad, e histológicamente presenta células continuas que ocupan los estratos epidérmicos basales. La mayoría de los subtipos de melanoma progresan hacia distintas fases histológicas, sin embargo el melanoma extensivo superficial, el melanoma acral, y el melanoma lentiginoso acral por lo general presentan una fase de crecimiento intraepidérmico inicial, mientras que el nodular presenta un crecimiento intradérmico invasivo *de novo*, ya que casi siempre comienza en la piel sin lesiones precursoras, lo que empeora el pronóstico (BERROCAL 2010).

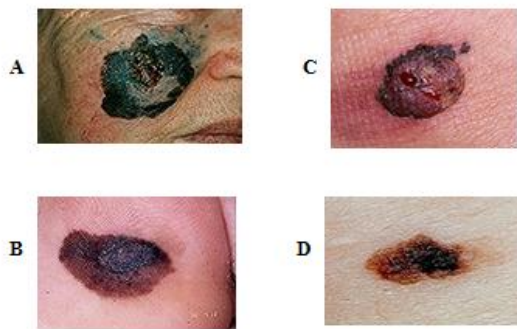


Figura 2. Subtipos de melanoma maligno cutáneo. **A.** Lentigo maligno melanoma. **B.** Melanoma lentiginoso acral. **C.** Melanoma nodular. **D.** Melanoma extensivo superficial. Imágenes tomadas de <http://web.udl.es/>.

El melanoma se puede desarrollar a partir de un nevo preexistente o sobre piel normal (figura 3a). El mismo comienza con una proliferación radial de los melanocitos, que es seguida por una fase de crecimiento vertical (PALMER *et al.* 2000). En la fase radial las células inicialmente se encuentran confinadas a la epidermis, o bien, invaden en forma local a la dermis superficial (ver figura 3b). Esta es una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad, por lo que el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado (cirugía) posibilitan su curación. La fase de crecimiento vertical implica que en algunos tipos de MM luego de un período variable que en general oscila entre uno y dos años, el patrón de proliferación de las células en la dermis se modifica ya que aparecen células nuevas que proliferan disponiéndose en nódulos esferoidales que se expanden más rápido que el resto del tumor (ver figura 3c). La dirección de crecimiento de dichas células resultante tiende a ser perpendicular a la fase de crecimiento radial, de allí la denominación de fase de crecimiento vertical. Esta fase implica mal pronóstico, dado que la infiltración de las capas inferiores de la piel posibilita la diseminación de las células neoplásicas a través de los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos regionales o, a través de los vasos sanguíneos a cualquier órgano. A nivel clínico se caracteriza por una lesión protruída o sobreelevada.

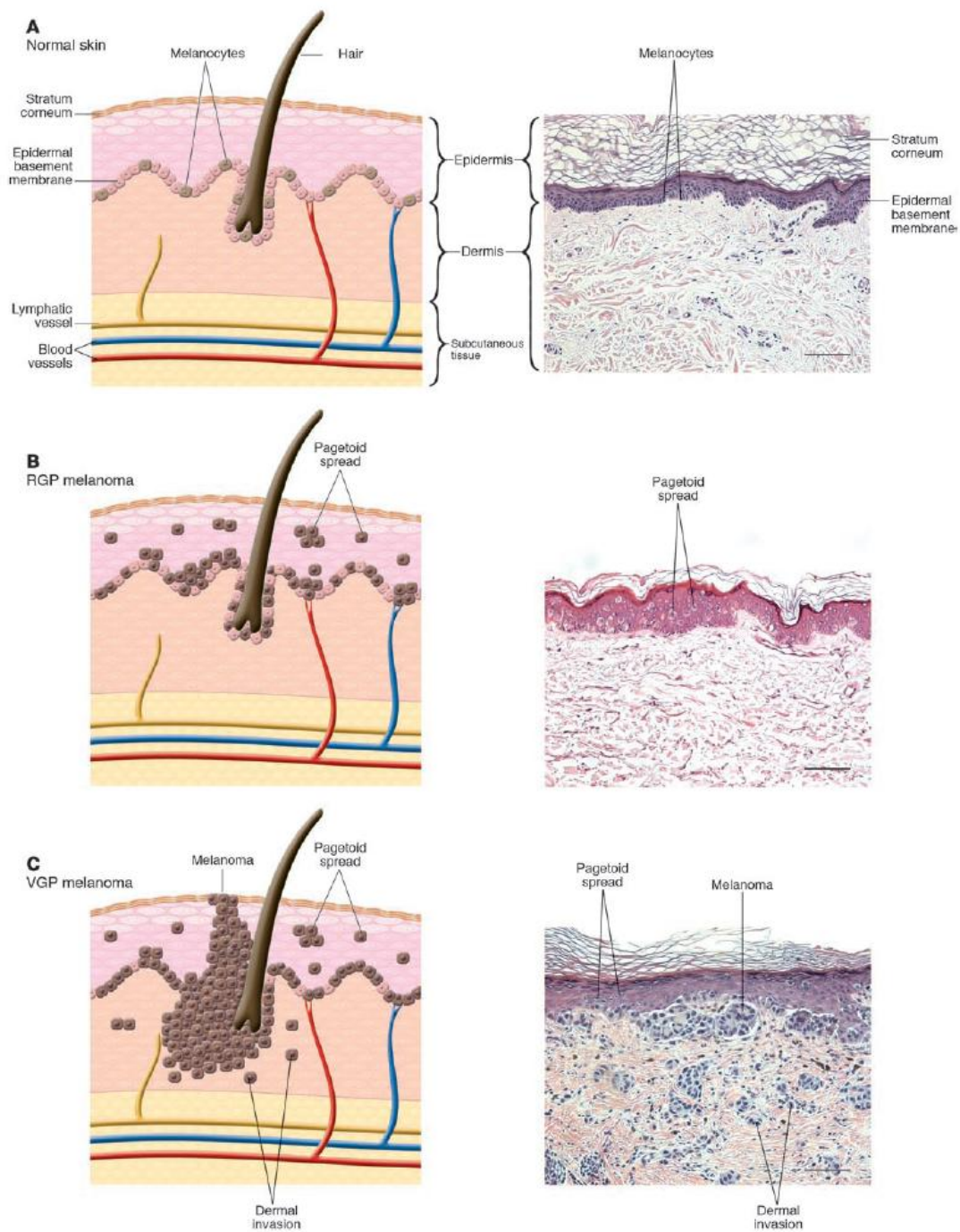


Figura 3. A-Piel normal. **B-**Melanoma in situ, en fase de crecimiento radial (RGP).Las células no penetran la membrana basal epidérmica. **C-**Melanoma maligno en fase de crecimiento vertical (VGP).Los melanocitos — penetran la unión dermis-epidermis (CHUDNOVSKY *et al.* 2005).

A gran escala, el melanoma de la piel se estima que a nivel mundial ocupa el decimosexto lugar en incidencia en cáncer tanto en hombres como en mujeres. Es un tumor emergente con un incremento en la tasa de incidencia desde mitad de siglo más que nada en poblaciones de origen caucásico. La tasa de incidencia se define como el número de casos nuevos que ocurren por año en la población, geográficamente, es la mejor medida para conocer la ocurrencia de un tumor (casos/tiempo).

La incidencia del melanoma cutáneo varía entre las diferentes regiones geográficas (PARKIN *et al.* 2005) presentando una frecuencia de aparición que aumenta con la proximidad al ecuador en poblaciones caucásicas, ya que en poblaciones africanas y asiáticas la tasa de incidencia es muy baja. En las poblaciones indígenas del norte de Australia para las cuales las tasas de incidencia de MM son bajas en relación al resto de Australia, no existen muertes por melanoma. Esto confirma que el melanoma maligno se origina en poblaciones europeas y no con las poblaciones autóctonas (ACTON *et al.* 2004; CONDON *et al.* 2003; CRESS and HOLLY 1997). De esta manera Oceanía es el continente que presenta mayor incidencia de MM ya que en Australia y Nueva Zelanda se obtienen las tasas más altas de incidencia de la enfermedad. Por lo que en regiones donde la población caucásica es predominante (FERLAY *et al.* 2010) se obtiene la mayor frecuencia de aparición del melanoma. En estos países el cáncer de piel es el 4º cáncer más frecuente en los hombres y el tercero más frecuente en las mujeres. El segundo lugar lo ocupa América del Norte. Sin embargo las menores tasas de incidencia de MM se encuentran en África y Asia siendo de aproximadamente de 1.5 en hombres y 1.8 en mujeres por 100.000 habitantes, y de 1.28 en hombres y 1.16 en mujeres por 100.000 habitantes respectivamente (PARKIN *et al.* 2005).

Desde el punto de vista epidemiológico, el problema principal planteado por esta neoplasia radica en el notable incremento observado en las tasas de incidencia de esta enfermedad en estas últimas décadas. El incremento anual del melanoma ha sido de 3-7% para las poblaciones europeas (BEVONA and SOBER 2002; DIEPGEN and MAHLER 2002). Las tasas anuales más altas son encontradas en Australia y en Nueva Zelanda con 56 casos por 100.000 habitantes sin diferencias significativas entre sexo (JONES *et al.* 1999; LENS and

DAWES 2004). Otros países que presentan altas tasas de incidencia de melanoma son Estados Unidos y Canadá (4.8% y 3.1% para hombres y mujeres respectivamente durante el período 1969-1993) (BULLIARD *et al.* 1999). En Europa en el año 1990 las tasas anuales más altas de incidencia de MM se han reportado en Escandinavia, con 15 casos por 100.000 habitantes (GARBE and BLUM 2001; MANSSON-BRAHME *et al.* 2002) y en Alemania con 10-12 casos por 100.000 habitantes (GARBE and BLUM 2001). Las tasas más bajas dentro de Europa se encuentran en los países mediterráneos con tasas de incidencia de MM de 5-7 casos por 100.000 habitantes (OCANA-RIOLA *et al.* 2001; STRACCI *et al.* 2005). Aunque el MM es un tumor cuya frecuencia de aparición aumenta en regiones cercanas al Ecuador, en Europa se observa un patrón inverso, donde aparece una mayor frecuencia de la enfermedad en los países del Norte que del Sur. En este gradiente norte-sur, la incidencia del MM es debido probablemente a la interacción entre las características constitucionales y ambientales de las diferentes poblaciones (DE VRIES and COEBERGH 2004). En regiones tan diversas desde el punto de vista geográfico como Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia, las personas de origen europeo de dichos países presentan una mayor incidencia del MM en las zonas más próximas al Ecuador. Por lo que el riesgo a desarrollar melanoma cutáneo entonces estaría determinado por la pigmentación cutánea y la radiación UV y además el mismo sería mayor en poblaciones de piel clara que habitan en regiones cercanas al Ecuador.

A lo largo de esta década, las estimaciones realizadas a nivel mundial por la International Agency for Research on Cancer (IARC) en el año 2000 (PARKIN *et al.* 2001) mostraron que la tasa de incidencia ajustada por edad a la población mundial estándar de Estados Unidos fue de 13,3 casos por 100.000 en hombres y 9 casos por 100.000 en mujeres. Mientras que en Australia y Nueva Zelanda estas tasas están superando los 30 casos por 100.000, tanto en hombres como en mujeres. De esta forma las tasas de incidencia del tumor, duplican a las tasas de América del Norte y Europa del Norte.

Por otro lado en el año 2002 según la IARC se registraron 160.167 casos nuevos en el mundo, de los cuales 79.032 correspondían a hombres y 81.135 a mujeres. En Europa se diagnosticaron aproximadamente 60.000 nuevos casos al año, referidos 26.100 en varones y 33.300 en mujeres Sin embargo, en Estados Unidos de 7.5 casos por 100.000 habitantes en 1973, se han

registrado en el 2002, 16.4 casos por 100.000 habitantes en los hombres y 11.7 en mujeres (FERLAY *et al.* 2004; PARKIN *et al.* 2005).

En el 2008, el IARC determinó que la tasa de incidencia ajustada por edad a la población estándar de Estados Unidos fue de 15.8 casos por 100.000 en hombres y 12.5 por 100.000 en mujeres. Mientras que para Australia y Nueva Zelanda fue de 41.8 y de 32.1 por 100.000 habitantes para casos hombres y mujeres respectivamente (ver figura 4). De estos resultados se puede concluir que la tasa de incidencia ajustada por edad ha ido incrementando con el tiempo. Para América del Sur la tasa de incidencia ajustada por edad ha sido de 2.1 y de 1.8 por 100.000 habitantes para hombres y mujeres respectivamente (ver figura 4) (FERLAY *et al.* 2010).

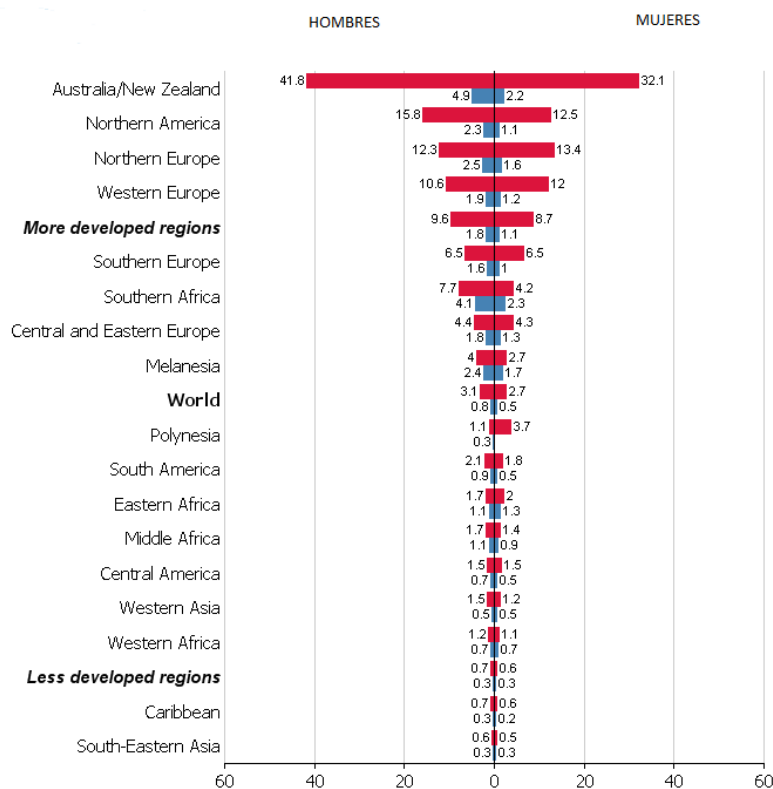


Figura 4. Incidencia de melanoma cutáneo mundial según las distintas regiones (Globocan 2008, IARC, <http://globocan.iarc.fr/>). Las regiones más desarrolladas (More developed regions) se refieren a todas las regiones de Europa, más Norteamérica, Australia, Nueva Zelanda y Japón. Las regiones menos desarrolladas (Less developed regions) se refieren a todas las regiones de África, Asia (excepto Japón), Latinoamérica y el Caribe, Melanesia, Micronesia y Polinesia.

Además la relación por sexo varía según la incidencia del MM en las distintas áreas geográficas. De esta manera en Estados Unidos las mujeres presentan ligeramente una tasa de incidencia mayor que los varones antes de los 40 años, sin embargo después de los 40 años los hombres presentan una mayor incidencia de la enfermedad. En otros países donde la tasa de incidencia del melanoma maligno es muy alta la relación hombres-mujeres es 1:1 y en países donde la incidencia es menor porque hay menos exposición solar como Europa, existe una leve predisposición del sexo femenino (KATALINIC 2003).

En Latinoamérica existe una tasa intermedia de incidencia de melanoma esporádico para la cual la información de poblaciones basada en registros de tasas de incidencia de melanoma cutáneo ha sido raramente reportados. Entre 1998 y 2002 se han registrado un total de 4465 casos de melanoma cutáneo reportados en Latinoamérica (SORTINO-RACHOU *et al.* 2011).

En la figura 5 se muestra que la tasa de incidencia de MM en Uruguay ocupa uno de los primeros puestos al igual que Argentina según los datos reportados en Globocan 2008 y otros registros de información de cáncer. La tasa de incidencia en los hombres es levemente mayor que la de las mujeres para la mayoría de estos países.

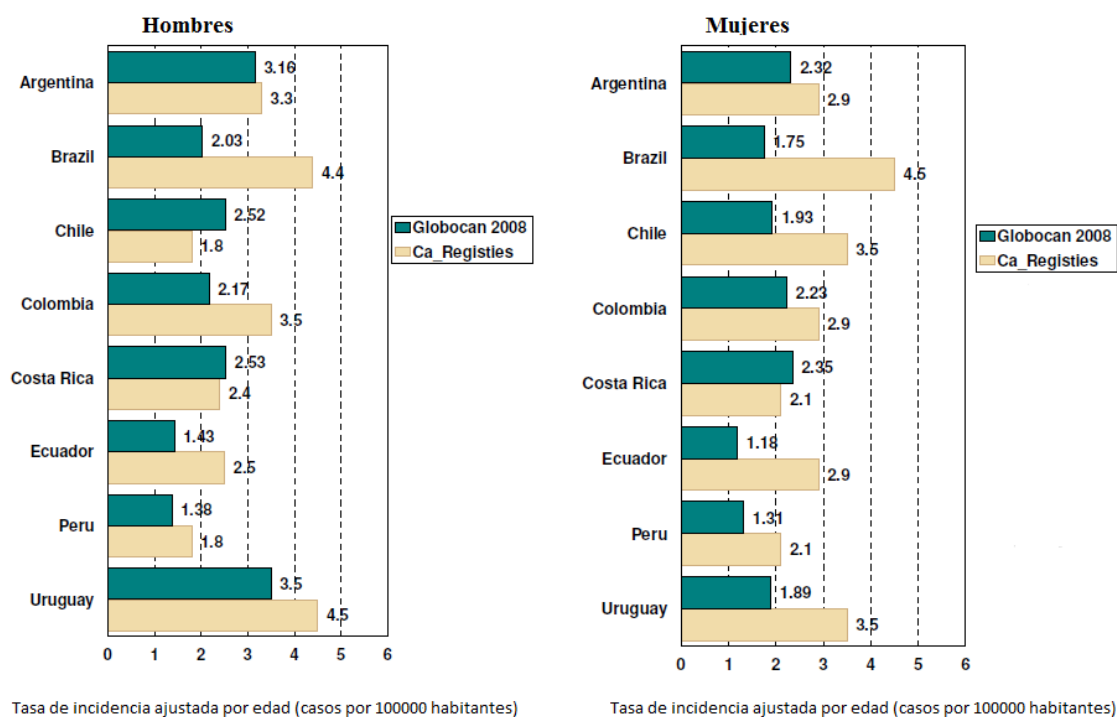


Figura 5. Incidencia del melanoma en Latinoamérica para hombres y mujeres. El sombreado verde indica el registro de la incidencia del MM según Globocan 2008(<http://globocan.iarc.fr>). El sombreado beige indica la incidencia del MM según el National Program of Cancer Registries (NPCR) (<http://www.cdc.gov/cancer/npcr/>).

SITUACIÓN EN URUGUAY

En Uruguay el MM es una variedad de cáncer rara en relación a otros tipos de cánceres ya que dentro de los tumores de piel es menos común que el carcinoma espinocelular y el basocelular pero es muy agresivo ya que tiene un peor pronóstico (VASALLO 1997). Presenta una elevada tasa de mortalidad (2 casos por cada 100.000 habitantes en todo el país) que expresada en términos de tasas ajustadas por edad es de 1.33 muertes por 100.000 habitantes para hombres y de 0.57 muertes por 100.000 habitantes para mujeres durante el período 1989-1993. Sin embargo durante el año 2008 la tasa de mortalidad, también expresada en términos de tasas ajustadas por edad fue de 1,9 casos por 100.000 en hombres y de 0,89 en mujeres. Por otra parte, la tasa de incidencia ajustada por edad durante el período 1991-1995 en hombres es de 2.44 y de 2.11 para las mujeres (VASALLO 1997), mientras que en el año 2008 la incidencia fue de 3.5 por 100.000 habitantes en hombres y de 1.89 en mujeres (FERLAY *et al.* 2010). El análisis de las tendencias de las tasas de incidencia y mortalidad de MM en Uruguay, en el último decenio ha mostrado un crecimiento sostenido durante las últimas 3 décadas con una dinámica menor que la verificada en los Estados Unidos. Según datos recolectados en el III Atlas de incidencia del cáncer en el Uruguay (BARRIOS 2010) se observa que las mujeres presentan la mayor tasa de incidencia del melanoma maligno en Soriano (figura 6A) y para los hombres (figura 6B) la mayor incidencia de MM se da en Montevideo observándose para ambos una menor incidencia en el interior del país.

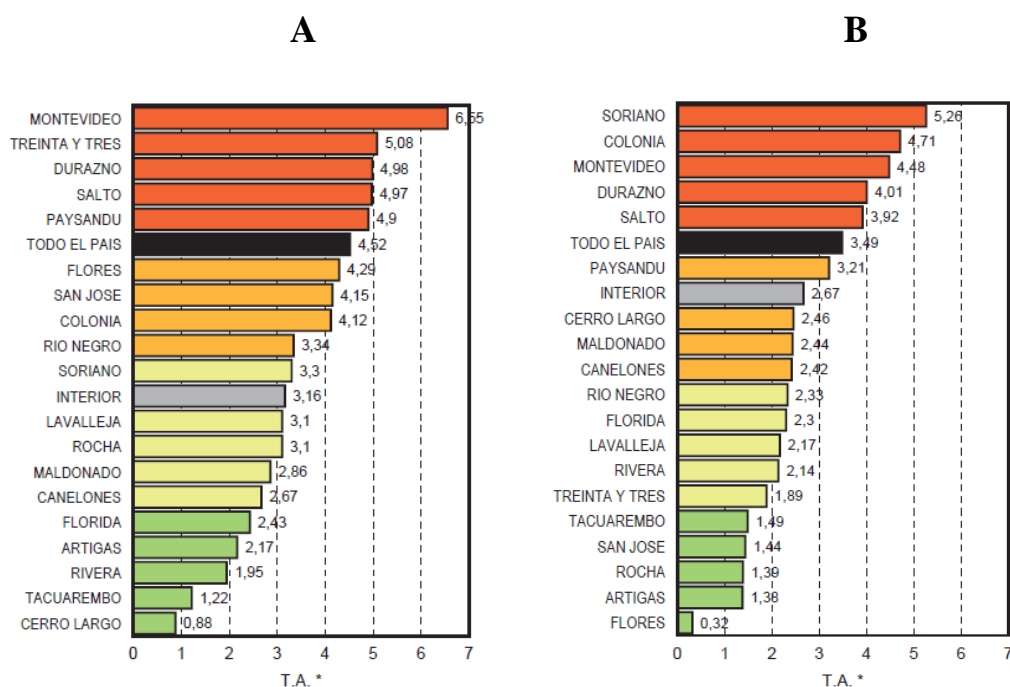


Figura 6. Incidencia del melanoma cutáneo en el Uruguay en el período 2002-2006 en hombres (A) y en mujeres (B). T.A (Tasa estandarizada por edad, población mundial estándar (casos x 100.000) Tomada de III Atlas de incidencia del cáncer en el Uruguay 2010 (BARRIOS 2010).

FACTORES DE RIESGO AMBIENTALES

Como en muchos cánceres, el MM es una enfermedad compleja, cuya etiología se mantiene incierta. Sin embargo se sabe que tanto los factores genéticos como ambientales contribuyen al desarrollo del mismo. Muchos estudios han detectado que existen varios factores de riesgo al MM (AVILES *et al.* 2011; BATAILLE 2003; MACKIE *et al.* 1989). Entre los principales factores de riesgo al MM están el color de pelo y ojos claros, color de piel blanca, y la capacidad de quemarse al sol (fototipo I y II), la exposición solar intermitente en la niñez, quemaduras solares en la niñez, la presencia de lunares o nevos atípicos y la historia familiar de nevos atípicos, también son factores importantes en la etiología del melanoma.

EXPOSICIÓN SOLAR

Dentro de los factores ambientales, la exposición solar excesiva a la radiación ultravioleta así como las quemaduras solares repetidas se consideran las principales causas del melanoma (KOH *et al.* 1990). La exposición solar durante la niñez parece ser el principal factor de riesgo al MM ya que se piensa que la radiación UV debe programar a las células en un estadio temprano (WHITEMAN *et al.* 2001).

La exposición solar se clasifica en una forma intermitente y/o crónica, la primera se refiere a un patrón intermitente y severo de exposición solar que se da en actividades recreacionales como en las vacaciones (exposición vacacional). La última se refiere a una exposición solar constante y continuo, a éste patrón se le llama exposición solar ocupacional (GANDINI *et al.* 2005a).

Existe una estrecha correlación entre la irradiación solar y el desarrollo de melanoma. En la radiación solar participan entre otros los rayos ultravioletas (RUV). Estos tienen una acción nociva sobre el material genético. Dentro de los RUV es posible distinguir 3 grupos:

a) UVC (de 215 a 290nm): Son los más energéticos pero son completamente rechazados por la atmósfera terrestre.

b) UVB (290 a 320nm): estos son parcialmente rechazados por la capa de ozono, por lo que llegan con una gran intensidad cuando los rayos son perpendiculares (al mediodía) y se vinculan con la intolerancia solar. Son más energéticas que las A, por lo que deberían ser las principales responsables de las lesiones cutáneas, pero la capa de ozono las retiene debido a su menor longitud de onda. Por lo que la mayor radiación que recibimos es de tipo A (KULLAVANIJAYA and LIM 2005).

c) UVA (320 a 400nm): están presentes desde el amanecer al ocaso, y son los responsables del bronceado (CAÑIGRAL 1999).

La relación entre el melanoma y la exposición solar se ha confirmado en estudios de latitud y en estudios de migraciones. Los primeros indican que las personas blancas sufren más

melanomas cuanto más cerca del Ecuador estén. La radiación ultravioleta es mayor en las zonas más próximas al Ecuador, especialmente en las horas del mediodía. Las personas que viven en lugares soleados, y/o en grandes alturas, están más expuestos a la luz solar, y por lo tanto están más expuestas a la radiación UV. También tiene influencia la latitud sobre la intensidad de dichas radiaciones ya que en las zonas cercanas al Ecuador tienen una mayor intensidad porque hay menos distancia a través de la atmósfera hasta la superficie de la tierra, y porque los rayos solares llegan más perpendicularmente (GILCHREST *et al.* 1999).

En cuanto a los estudios de migraciones se ha visto que estas tasas aumentan cuando la población cambia de residencia desde una zona de baja exposición a una de alta exposición solar. Como ejemplo Australia, que es el país con mayor incidencia de MM en el mundo, posee una alta población de origen británico, dándose la circunstancia que en el Reino Unido las tasas de incidencia no son tan altas (DENNIS *et al.* 2003). En este estudio se mostró que el riesgo es mayor cuando la migración del individuo se da antes de los 30 años, ya que podría haber sufrido un período de exposición solar crítico en su vida (AUTIER and DORE 1998).

FENOTIPO CUTÁNEO

El fototipo define la tendencia que tiene la piel a las quemaduras solares, y la capacidad de broncearse al sol. La clasificación más utilizada en la actualidad es la de Fitzpatrick (FITZPATRICK 1988) (ver anexo III). Las pieles claras con tendencia a quemarse tras exponerse a rayos UV (fototipos I y II) presentan un mayor riesgo al desarrollo de un melanoma (GANDINI *et al.* 2005a). Esto se debe a que las pieles más claras y el color de pelo pelirrojo se asocian con el pigmento feomelanina, (PHO *et al.* 2006) el cual contribuye a la generación de fotoproductos mutagénicos tras la exposición solar, por lo que protege menos al ADN del daño causado por dicha radiación (HILL *et al.* 1997).

El pelo rubio y/o pelirrojo, el color claro de ojos y la tendencia a desarrollar pecas parecen producir un mayor riesgo al melanoma cutáneo (GANDINI *et al.* 2005a) De acuerdo a la IARC, los nevos son máculas pigmentadas de color marrón o negro que están bien definidas y que son más oscuras en color que la piel circundante. Son marcadores de riesgo de padecer MM. Un melanoma puede originarse a partir de tumores melanocíticos benignos como los nevos melanocíticos congénitos o adquiridos y los nevos displásicos. Los nevos congénitos, los cuales son los nevos que están presentes en el nacimiento o en los dos primeros años de vida, presentan un riesgo del 2% de desarrollar melanoma, mientras que en el caso que estos nevos sean “gigantes” o sea que midan más de 20 cm de diámetro aumenta el riesgo en un 5-20% de padecer la enfermedad. Estos suelen aparecer antes de la pubertad y se originan en las capas más profundas de la dermis (SWERDLOW and GREEN 1987).

La presencia de múltiples nevos, ya sean adquiridos o congénitos, de los llamados “irregulares o atípicos” también constituye un factor de riesgo. Estos presentan características atípicas tanto clínicamente como histológicamente. Por ello se considera a los nevos atípicos como marcadores de riesgo y se caracterizan por ser más grandes que los lunares normales, presentar diferentes colores, y tener límites irregulares. Estos se pueden presentar de forma esporádica o familiar. La presencia de estos nevos aumenta el riesgo de padecer MM hasta 10 veces para aquellas personas que presenten el síndrome del nevo atípico y además tengan antecedentes familiares de melanoma (GANDINI *et al.* 2005b). El riesgo aumenta conforme haya mayor cantidad de nevos atípicos aunque su papel como lesión precursora es bastante controvertido. La presencia de los nevos atípicos cerca de un melanoma se observa en el 20-40% de los casos de pacientes. Por lo que entonces la mayoría de los melanomas no se originan de un nevo preexistente (DURAY and ERNSTOFF 1987; HALPERN *et al.* 1993; RHODES *et al.* 1983).

Uno de los factores que aumenta significativamente el riesgo a padecer MM es la existencia de antecedentes familiares, o sea, el hecho de ser portadores de mutaciones genéticas que aumenten la susceptibilidad a padecer melanoma maligno.

La mayoría de los melanomas son esporádicos, pero entre el 5-10% son del tipo familiar o hereditario. Se ha estimado que el riesgo para los familiares de primer grado de una persona afectada por MM es de 1.74 (GANDINI *et al.* 2005b). La predisposición genética en familias es en parte atribuible a dos genes de susceptibilidad: CDKN2A, el cual se halla en el cromosoma 9p21 y el gen CDK4 que se localiza en el cromosoma 12. Ambos genes son de alta penetrancia que actúan directa o indirectamente en el punto de control G1/S del ciclo celular. El gen CDKN2A codifica una proteína denominada p16, esta recluta células en la fase G1/S mediante la inhibición de la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4). Hasta 40% de los melanomas hereditarios pueden resultar de mutaciones en este gen conduciendo a una proteína no funcional (HUSSUSSIAN *et al.* 1994; KEFFORD *et al.* 2002; RIZOS *et al.* 2001a; RIZOS *et al.* 2001b).

La proteína CDK4 se asocia a otra proteína CCND1 para fosforilar e inactivar a Rb y este gen actúa como oncogén en vez de gen supresor de tumores. Sin embargo mutaciones en este gen y en otras ciclinas son raras en el desarrollo del MM (MILLER and MIHM 2006).

En Uruguay se ha encontrado una mutación no sinónima característica de nuestra población para el gen CDKN2A (E88X), la cual ha sido previamente reportada como un cambio somático en líneas celulares de melanoma y en otros tumores como carcinoma de cuello y cabeza. Dicha mutación fue hallada en familias sin parentesco y da lugar a una proteína truncada. Esto se explicaría por un efecto fundador en la región del Mediterráneo debido a la historia familiar que presentaron los pacientes (LARRE BORGES *et al.* 2009). Además la posibilidad de un ancestro común entre ambas familias tampoco se excluyó.

Si bien el melanoma esporádico constituye el 90% de los melanomas, no se conoce aún que genes están directamente implicados en su etiología. Entre los principales genes candidatos está el MC1-R, el cual es un gen de susceptibilidad de bajo riesgo al MM, que pertenece a

la familia de los receptores acoplados a proteínas G y está localizado en el cromosoma 16q24.3.

GEN MC1-R

Este gen tiene un Open Reading Frame (ORF) de 951 pb y está compuesto por solo un exón (GANTZ *et al.* 1994). Dicho gen fue uno de los primeros genes asociado con la variación en la pigmentación humana y por ende es el predictor más importante del color de piel y de pelo dentro de la población caucásica (BEAUMONT 2011). Dicho gen es muy polimórfico en poblaciones caucásicas ya que se han descrito al menos 70 variantes (WONG and REES 2005).

Este es el primer gen humano en el cual se describieron variaciones en la región codificante que son las responsables de los diferentes fenotipos en la variación de la pigmentación tales como el color de pelo pelirrojo (Valverde *et al.* 1995). Sin embargo la contribución de los diferentes alelos al color de pelo y a la pigmentación, así como la cantidad de pecas y la capacidad de quemarse al sol no está del todo definido aún. El mecanismo de acción del MC1-R consta de la unión de la hormona α -MSH al receptor, dicha unión influye en la actividad enzimática de las enzimas que participan de la vía y la melanogénesis y contribuye al cambio de feomelanina (de color rojo/amarillo) a eumelanina (marrón/negro) (BARSH 1996). La estimulación hormonal del MC1-R es también esencial para la respuesta de los melanocitos a las quemaduras tras la exposición a radiación ultravioleta (IM *et al.* 1998; TADA *et al.* 1998). Se ha visto que el tratamiento con la alfa melanocortina protege a los melanocitos de la acción de los radicales libres mediante inducción de la enzima catalasa o mediante la estimulación del tráfico intracelular de la catalasa a la periferia celular (MARESCA *et al.* 2010). Si bien se sabe que existen variantes del gen MC1-R que confieren susceptibilidad al melanoma, los mecanismos moleculares por los cuales este gen protege a los melanocitos de la transformación maligna a melanoma aún no se conoce con certeza (KENNEDY *et al.* 2001; SMITH *et al.* 1998).

Mutaciones a nivel de la región codificante del receptor de melanocortina da lugar a un receptor defectuoso (FRANDBERG *et al.* 1998; SCHIOTH *et al.* 1999), el cual se asocia a un color de pelo pelirrojo y/o rubio y piel clara denominado fenotipo RHC, el cual se origina por la alta producción de feomelanina en vez de eumelanina. En varios estudios, se encuentra que el color de pelo pelirrojo, la piel clara, presencia de pecas y la capacidad de quemarse al sol está asociado a variaciones en el gen MC1-R (R151C, R160W, y D294H) (Rees 2003; HEALY 2004; HAN *et al.* 2006; KADEKARO *et al.* 2010.; KENNEDY *et al.* 2001; PALMER *et al.* 2000). Estos fenotipos se asocian a un alto riesgo de padecer MM (BLISS *et al.* 1995) y también se vio que la presencia de más de una de éstas variantes del gen MC1-R también aumenta el riesgo al melanoma (HEALY *et al.* 1999; VALVERDE *et al.* 1996).

Dichas variantes son alelos recesivos de alta penetrancia y equivalen a mutaciones de pérdida de función de la proteína MC1R, sin embargo otras mutaciones como V60L, R163Q y V92M son alelos de baja penetrancia, por lo que no son alelos funcionalmente significativos y se las denomina no-RHC (DUFFY *et al.* 2004). Se ha visto en estudios previos que los individuos de pelo pelirrojo en su mayoría son portadores homocigotos o heterocigotos para dos de las variantes RHC. Sin embargo se sabe que también pueden existir una gran proporción de individuos heterocigotos (13%) con una única variante RHC que presentan un color de pelo “rubio aframbuesado” (“strawberry blond hair”) más que un color de pelo pelirrojo puro (FLANAGAN *et al.* 2000). Los alelos R tienen una asociación familiar con el fenotipo RHC con OR (odd ratios) mayores a 50 (STURM *et al.* 2003) y muchos de esos alelos son comunes en poblaciones del Norte de Europa (RAIMONDI *et al.* 2008). Sin embargo, entre estos fenotipos, las variantes de MC1-R y la asociación con el melanoma no parece ser tan clara y por lo tanto, genera controversias sobre su significado. Estas contradicciones parecen estar vinculadas al origen de la población, ya que mientras en poblaciones del norte de Europa la asociación es significativa (PALMER *et al.* 2000), en poblaciones mediterráneas estas variantes del MC1-R no parecen estar asociadas a la pigmentación de la piel o al color del pelo, pero sí al melanoma (BASTIAENS *et al.* 2001; LANDI *et al.* 2005). En base a lo mencionado anteriormente los diferentes estudios epidemiológicos han puesto su atención en estudiar poblaciones de origen europeo.

Para lograr identificar en forma precoz los signos clínicos de la presencia del melanoma en una lesión melánica, o de aquella aparecida sobre la piel sin lesiones previas, la American Cancer Society ha publicado los criterios ABCD para ayudar a la identificación de una lesión como sospechosa, que refiere a la asimetría de la lesión pigmentada, límites (bordes) irregulares, variación del color dentro de la lesión abigarrados o negro intenso, diámetro mayor a 6mm. El cambio de color, tamaño o forma de una lesión representa un signo temprano para identificar al tumor. El sangrado, la ulceración y el dolor representan signos tardíos y síntomas relacionados con enfermedad avanzada (ABBASI *et al.* 2004). Asimismo la detección precoz de estos tumores es de suma importancia ya que permitirá reducir significativamente la tasa de mortalidad. El diagnóstico se certifica mediante la anatomía patológica sucesiva a la extirpación quirúrgica del tumor. Además, la incorporación de las técnicas de dermatoscopia ha ayudado significativamente al diagnóstico de este tumor cutáneo. Esta técnica constituye una herramienta muy útil para diferenciar lesiones pigmentadas sin recurrir a la cirugía (CARLI *et al.* 2000) La misma es una técnica no invasiva de examen *in vivo* que utiliza un sistema de magnificación con luz incidente, que posibilita el estudio detallado de las estructuras de la epidermis, la unión dermo-epidérmica y la dermis superficial no visibles a la exploración a ojo desnudo (ARGENZIANO and SOYER 2001). En la actualidad se está trabajando en la puesta en marcha de dos técnicas de diagnóstico avanzado. Una de ellas es la microscopía confocal de reflectancia, que permite seleccionar aquellos bordes mal definidos y orientar la extirpación exacta de la lesión en tiempo real (GERGER *et al.* 2005). Por otro lado, la dermatoscopia digital multiespectral es capaz de fotografiar la lesión pigmentada, procesar las imágenes y emitir un diagnóstico preciso (BURGUÉS- CALDERÓN 2011). La información obtenida se completa con el estudio clínico y permite orientar el tratamiento más adecuado.

En Uruguay la dermatoscopia ha permitido una conducta conservadora en más de 96% de las lesiones enviadas a estudio dermoscópico evitando posibles complicaciones derivadas de la cirugía y abatiendo costos en salud (MARTÍNEZ ASUAGA *et al.* 2003).

Como sucede en el resto de los cánceres, el pronóstico del melanoma está condicionado por el estadio en el momento del diagnóstico:

En la estadificación microscópica del tumor existen dos hallazgos que tienen una gran importancia pronóstica que son el grosor tumoral, el índice mitótico y la presencia de ulceración. La ulceración es la ausencia histológica de epidermis por encima del tumor. El grosor tumoral se establece utilizando dos sistemas, un sistema basado en la medición milimétrica del grosor (índice de Breslow) y un sistema basado en el nivel cutáneo de invasión (niveles de Clark). Los niveles de invasión de Clark, describen la invasión de la tumoración en los diferentes niveles cutáneos. Los estadios son 5 y se caracterizan por las siguientes características:

Estadio I describe los tumores puramente epidérmicos. El *estadio II* indica que la tumoración atraviesa la unión dermo-epidérmica con invasión de la dermis papilar;. Se consideran factores clínicos, histológicos y moleculares para ambos estadios. *Estadio III* describe las tumoraciones que ocupan toda la dermis papilar expandiéndola, presencia de afectación ganglionar. *Estadio IV* indica que la tumoración infiltra la dermis reticular, es cuando la enfermedad está diseminada (HERRERA SAVAL and MARÍA 2001). El nivel V indica la invasión del tejido graso subcutáneo.

FACTORES CLÍNICOS: Cuando el melanoma se desarrolla sobre un nevo preexistente, el pronóstico es mejor que en aquellos melanomas originados sobre piel sana (BERROCAL *et al.* 2010).

FACTORES HISTOLÓGICOS: El espesor y la ulceración son actualmente los factores pronósticos más importantes en el melanoma cutáneo. En general la supervivencia disminuye a medida que aumenta el espesor del tumor.

Los melanomas de menos de 0.76 mm de Breslow tienen una supervivencia a los 10 años del 92% mientras que para los de más de 4 mm de espesor es del 42% y a partir de los 6 mm de espesor no existen diferencia de supervivencias (VOLLMER 1989).

FACTORES MOLECULARES: Se ha demostrado mediante citometría de flujo, el valor pronóstico de la cantidad de DNA. La aneuploidía se correlaciona con otros factores pronósticos como el nivel de invasión, el espesor del tumor y la presencia de ulceración. Tanto la aneuploidía como la multiclonalidad, líneas multitetraploides y la fase S más larga, se relacionan directamente con la aparición de metástasis, e inversamente con la supervivencia y el tiempo libre de enfermedad (ORDOÑEZ GALLEGO *et al.* 1998).

También la presencia de proteína *S100B* en suero ha demostrado ser el nivel pronóstico más importante en pacientes con melanoma cutáneo diseminado (HAMBERG *et al.* 2003). Las moléculas de adhesión tienen gran importancia tanto en la producción de metástasis como en el desarrollo y supervivencia de las células tumorales (VOLLMERS and BIRCHMEIER 1983).

El mejor tratamiento es la cirugía para el caso del estadio I y tratamiento adyuvante con Interferón alfa en el caso del estadio II.

En esta fase de la enfermedad ganglionar regional, el factor pronóstico más importante es el *número de metástasis ganglionares*, ya sea en forma macroscópica como microscópica en el estudio del ganglio centinela (KONSTADOUAKIS *et al.* 2002). Los tratamientos más eficaces para este estadio son la cirugía, aunque cuando esta no es eficiente se recurren a otros tratamientos como la radioterapia (WHEATLEY *et al.* 2003), tratamiento con Interferón alfa el cual ha demostrado un beneficio en la supervivencia libre de enfermedad, y también está la inmunoterapia que emplea vacunas en casos muy individualizados.

En todos los estudios realizados los factores pronósticos más predictivos fueron: la localización de las metástasis, el número de sitios afectados y los niveles séricos elevados de LDH. Por su valor pronóstico este marcador se ha incorporado a la clasificación por estadios de la American Joint Comité on Cancer 2002 (AJCC) desde el 2002. Los niveles de la proteína sérica SB100 también son considerados marcadores séricos, pero presentan menores valores que LDH (ORTIZ *et al.* 2003). Los pacientes con metástasis en piel, subcutáneo o ganglios distantes, tienen mejor pronóstico que si las metástasis son en pulmón, y éstos a su vez mejor que si son en otras localizaciones, como el hígado o cerebro. Aquéllos con valores de LDH elevados tienen peor pronóstico independientemente del lugar o del número de metástasis (BARTH *et al.* 1995). El mejor tratamiento para estos

pacientes es la cirugía, radioterapia, quimioterapia y la inmunoterapia (ATKINS *et al.* 1999; BALLO and ANG 2004; FLAHERTY 2006; MORONE *et al.* 1998).

HERRAMIENTAS GENÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES COMPLEJAS

Desde 1920 Alterburg y Muller demostraron cómo utilizar los instrumentos y conceptos mendelianos para la disección de rasgos de herencia compleja. Dentro de las estrategias utilizadas para tal fin están los estudios de ligamiento en familias y los estudios de asociación poblacional usando casos y controles. Sin embargo, una alternativa propuesta en los últimos años es el método de mapeo genético por desequilibrio de ligamiento generado por mezcla, también denominado "Admixture Mapping" (AM) (CHAKRABORTY and WEISS 1988; MCKEIGUE 1998). Es una estrategia que metodológicamente se ubica entre los estudios de ligamiento en familias y los rastreos genómicos para asociación y que es aplicable a poblaciones genéticamente mezcladas.

En un estudio de ligamiento se busca encontrar marcadores genéticos que sean coheredados con el fenotipo en estudio (indirectamente con el gen que causa la enfermedad). Cuando un marcador genético y el gen causal del fenotipo están muy separados en el mismo cromosoma o están en cromosomas diferentes, estos se segregarán en forma independiente. Sin embargo, si el marcador se encuentra muy cerca del gen causal, el marcador y la enfermedad se heredarán juntos (ligados) en la familia. Cuanto más cerca se encuentre el marcador genético del gen causal del fenotipo, menor es la probabilidad de que sean separados durante el proceso meiótico. Estos estudios presentan como desventaja el bajo poder estadístico para detectar efectos modestos. Esto se debe a que en este tipo de estudios la ubicación del locus se realiza en un bloque de gran tamaño que podría contener cientos de genes, entonces genes de efecto menor podrían no ser detectados por ligamiento (CLERGET-DARPOUX 1998; RAO 2001). Además otra desventaja de este tipo de análisis es la existencia de penetrancia incompleta y heterogeneidad genética entre familias y posible

epistasis (ALTMULLER *et al.* 2001). Por otra parte se pueden generar falsos negativos productos de una mala estimación de la fracción de recombinación. Por último cabe destacar que este tipo de análisis, requiere de muchas familias, al menos tres generaciones, para llevarlos a cabo. De ahí la necesidad de utilizar otros métodos para encontrar genes de susceptibilidad de enfermedades multifactoriales.

Los estudios de asociación buscan relacionar un marcador genético particular con una enfermedad o un rasgo complejo en una población, más que dentro de familias (HIRSCHHORN *et al.* 2002; NEWTON-CHEH and HIRSCHHORN 2005). Por lo que no depende explícitamente de una genealogía sino de una aumentada o disminuida frecuencia de un alelo o un conjunto de alelos de una población afectada por una enfermedad dada comparada con un grupo control de individuos sanos. Se trata generalmente de estudios de cohortes prospectivas o de tipo casos-controles en los cuales se establece el peso relativo del componente genómico con respecto a otros factores como el ambiente, en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Los análisis de asociación también tienen desventajas como que el número de SNPs a analizar es muy alto mayor a 100.000 y además pierde poder cuando se emplea en poblaciones con una alta heterogeneidad genética. Por otra parte una de las mayores dificultades para llevar a cabo estos estudios es encontrar el grupo control adecuado ya que los controles deben tener el mismo acervo genético. Como estrategia alternativa es reclutar tríos (sujeto afectado y sus padres) y utilizar la información genotípica del cromosoma no transmitido de los padres como control. Esto reduce la posibilidad de encontrar falsos positivos por estratificación poblacional, además de que facilita la obtención de la muestra (LANDER and SCHORK 1994). Habitualmente para esta técnica se utilizan como marcadores genéticos a los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs). Estas variaciones pueden ser en sí mismas funcionales y estar relacionadas a la fisiopatología de la enfermedad, pero en la mayoría de los casos, son utilizadas para el mapeo y ubicación de los verdaderos sitios relevantes. Los dos acercamientos posibles son el del “*gen candidato*” cuando existe evidencia previa de funcionalidad de la variante, o el de la “*asociación indirecta*”.

Actualmente, los estudios de asociación genómicos (*genome wide association studies* GWAS) emergieron como una herramienta genética para detectar variantes comunes implicadas en enfermedades complejas. Esta técnica está siendo utilizada para la

realización de un *screening* del genoma completo (cubre todo el genoma con un denso número de SNPs, 500000 o más) con el fin de descubrir posibles regiones cromosómicas asociadas con la enfermedad. Se buscan asociaciones entre la variación genética común y un determinado carácter sin previo conocimiento de función o de posición. (EASTON and Eeles 2008). Estos estudios surgen como una poderosa herramienta para identificar genes de susceptibilidad al cáncer y utilizan plataformas que pueden genotipar cientos de miles de SNPs. Por lo que este método de estudio ha llevado recientemente a la identificación de decenas de loci en el genoma humano que están asociados con la susceptibilidad a padecer numerosas enfermedades complejas. Los marcadores genéticos utilizados principalmente son los SNPs, debido a su alta frecuencia en el genoma humano, su baja tasa de mutación y su facilidad de automatización. Analizar tal cantidad de polimorfismos puede llevar a la aparición de muchos resultados falsos positivos y por tanto es necesario imponer un factor de corrección muy exigente, así como estudios posteriores de replicación (FRAZER *et al.* 2009). Si bien esta es una herramienta genética muy poderosa para mapear genes en enfermedades complejas, tiene un alto costo, por lo que en Latinoamérica no es muy viable. Como una alternativa al GWAS surge el método de Mapeo por Mestizaje, el cual es menos costoso que el GWAS y es igual de efectivo que este. Además dicho método puede ser implementado en nuestro país debido a su estructura genética característica (BERTONI 2011). El mismo es un intermedio entre los estudios de asociación y los análisis de ligamiento (DARVASI and SHIFMAN 2005).

MAPEO POR MESTIZAJE

El método de Mapeo por Mestizaje, toma ventaja del desequilibrio de ligamiento generado en una población híbrida, para analizar genes de susceptibilidad a enfermedades multifactoriales. Dicho método consiste en que la enfermedad multifactorial en estudio debe tener una incidencia mayor en una de las poblaciones parentales con relación a la otra y no deben haber ocurrido muchas generaciones desde la formación de la estructura híbrida. El método de mapeo por mestizaje es similar a los estudios de asociación, los cromosomas

ancestrales se comparten entre los individuos afectados. Comparando el porcentaje de cromosomas ancestrales en una localización genómica específica con la ancestralidad general a lo largo del genoma en individuos afectados, es posible detectar una región que contenga variantes causales de la enfermedad. Además un exceso de ancestralidad en una determinada región cromosómica se puede comparar entre casos y controles (ver figura 7). La factibilidad de esta estrategia ya ha sido previamente demostrada en varios estudios teóricos. Los métodos que se emplean para determinar el mestizaje son estadísticos e incluyen el programa STRUCTURE (FALUSH *et al.* 2003; PRITCHARD *et al.* 2000) el cual es muy citado en la literatura, también hay otros como el ADMIXMAP (HOGGART *et al.* 2003; McKEIGUE *et al.* 2000), ANCESTRYMAP (PATTERSON *et al.* 2004), y el BAPS (CORANDER *et al.* 2003). Todos estos programas comparten un modelo Bayesiano (MCM) con dos principales afirmaciones: Equilibrio Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento entre los marcadores dentro de cada población. También existen otros métodos que se basan en estimaciones por máxima verosimilitud que estima la ancestralidad (BONILLA *et al.* 2004b). Este método requiere menos tiempo computacional (lleva minutos en vez de horas).

Además el AM tiene como ventaja un costo menor de genotipado que el de un GWAS ya que se emplean hasta 200 o 300 veces menos SNPs que en un GWAS.

La resolución del mapeo por mestizaje es generalmente mayor en comparación con los estudios de ligamiento pero menor que para los estudios de asociación. La región candidata encontrada puede variar en su longitud desde algunos centiMorgans hasta 20cM.

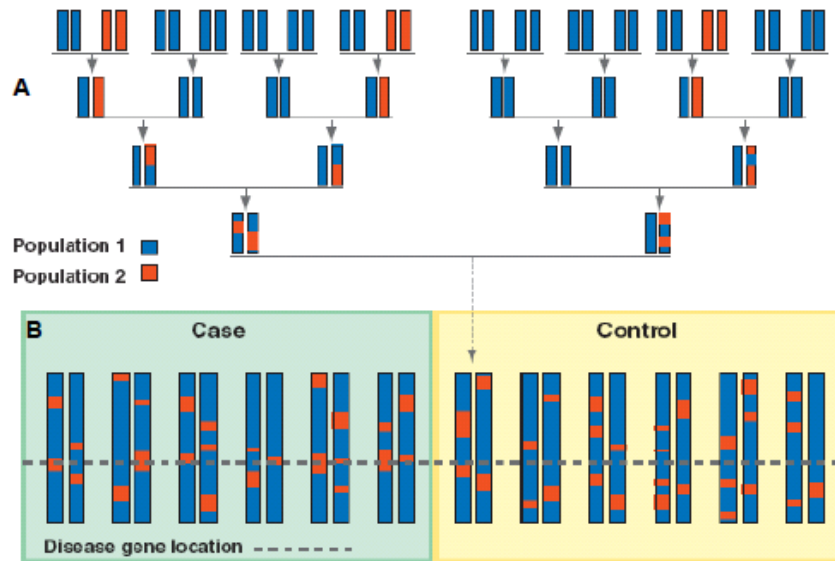


Figura7. A – Esquema de la distribución de cromátidas en familias con individuos de diferente origen. B – Distribución de las cromátidas en individuos afectados y control. La línea punteada indica la región con un exceso de cromátidas de una de las poblaciones parentales. Tomado de Darvasi y Shifman (2005).

Para poder llevar a cabo este método es necesario utilizar marcadores moleculares de ancestralidad que permitan mapear el genoma. Para ello, en los últimos años se ha diseñado un panel de marcadores adecuados, que permitan discriminar entre las diferentes poblaciones para poder realizar estimaciones de los aportes de las parentales que componen a una población híbrida, distribuidos a lo largo de los 22 cromosomas autosómicos y los sexuales (PRICE *et al.* 2008; PRICE *et al.* 2007). Dichos marcadores los cuales segregan en forma mendeliana, son denominados marcadores informativos de ancestralidad (MIAs) y presentan una frecuencia alélica característica de cada población parental. Para aplicar este método debe existir una gran diferencia en las frecuencias génicas de los MIAs entre las poblaciones parentales.

La metodología del Mapeo por Mestizaje ha permitido detectar asociaciones con determinadas enfermedades en poblaciones Latinoamericanas. Por ejemplo se ha detectado una asociación reciente entre la región del cromosoma 3q para el SNP rs181696 con pacientes fumadores de toda la vida con cáncer de pulmón. Además se encontró otra asociación entre el cromosoma 1 (rs6587361) para pacientes con cáncer de pulmón (SCHWARTZ *et al.* 2011). Otro ejemplo de aplicación de este método es la asociación de la

región genómica del cromosoma 22 con el riesgo aumentado de enfermedad crónica de riñón no diabética en individuos con ancestralidad africana (SHLUSH *et al.* 2010).

Otras asociaciones determinadas mediante esta metodología fueron las siguientes: asociación entre la región 6q24 y 21q21 para hipertensión (ZHU *et al.* 2005), el color de piel con el cromosoma 1 (q23. 2 – q32.1) (BONILLA *et al.* 2004b; SHRIVER *et al.* 2003), la región 8q24 con cáncer de próstata (FREEDMAN *et al.* 2006), o identificar el gen de la interleuquina 6 como candidato en explicar el aumento de marcadores de inflamación en enfermedades cardiovasculares (REICH *et al.* 2007).

APLICACIÓN DEL MAPEO POR MESTIZAJE EN LA POBLACIÓN URUGUAYA

La población uruguaya al ser una población mestizada es un blanco adecuado para utilizar esta estrategia para mapear genes de susceptibilidad al melanoma esporádico. La misma presenta una estructura trihíbrida donde su componente mayoritario es el europeo, luego el amerindio y finalmente el africano (SANS 2000); SANS *et al.* 1997). Además existe un gran cúmulo de información sobre su estructura genética y de la dinámica del poblamiento del territorio uruguayo (BERTONI *et al.* 2005; BONILLA *et al.* 2004a; GASCUE *et al.* 2005). Este origen trihíbrido de la población uruguaya se descubrió mediante estudios que se hicieron en 1986, y luego en 1991, basados en caracteres poligénicos con una alta frecuencia indígena: la presencia de la mancha mongólica y de dientes en pala. (SANS *et al.* 1986); (SANS *et al.* 1991a; SANS *et al.* 1991b). Posteriormente Sans y col (1997) publicaron un trabajo en donde se determinó la contribución de las tres poblaciones parentales en Tacuarembó y en Montevideo mediante el análisis genético de grupos sanguíneos ABO, MN, Duffy, Rh, enzimas eritrocitarias, proteínas séricas. Durante los últimos 5 siglos 3 poblaciones diversas se han encontrado y luego mezclado. Estas son en un orden cronológico: los pobladores originales amerindios, europeos (mayoritariamente de España y Portugal) y africanos (que fueron traídos como esclavos a Latinoamérica). La introducción de los esclavos provenientes de África comenzó al inicio del siglo XVI y culminó en 1850 en nuestro país. Por otra parte el número de europeos que entraron a Latinoamérica no se

conoce con exactitud ya que el influjo continuó en grandes cantidades hasta hace poco, de hecho la última ola de migración de europeos a Latinoamérica ocurrió cuando finalizó la segunda guerra mundial (SANS 2000).

Dado que el melanoma ocurre más frecuentemente en poblaciones de origen europeas, (GARBE and BLUM 2001), mediante la aplicación del mapeo por mestizaje, se esperaría obtener un exceso de ancestralidad europea en la muestra de los casos afectados por melanoma esporádico respecto a la muestra control en una determinada región cromosómica que contiene las variantes de riesgo al MM. Por esta razón es que en este trabajo de maestría se mapea el genoma de individuos enfermos con melanoma esporádico y pacientes sanos, según la ancestralidad, con el fin de detectar regiones cromosómicas y variantes comunes que estén implicadas en el desarrollo del melanoma. Además se estudia al gen candidato MC1-R y a la asociación de sus principales variantes con el riesgo al melanoma.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Identificar regiones cromosómicas y posibles genes candidatos asociados al melanoma esporádico mediante un acercamiento al mapeo por mestizaje, en la población uruguaya. Estudiar al gen candidato MC1R y su asociación con el riesgo al MM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analizar 61 MIAs en una muestra de 100 individuos afectados por MM y una muestra control de 109 individuos,
- b) Analizar 8 SNPs del gen MC1-R, para poder detectar si existe asociación entre este gen y el MM.
- c) Identificar factores de riesgo ambientales, fenotípicos y genéticos involucrados en el desarrollo de MM.
- d) Detectar posibles genes candidatos o regiones cromosómicas que estén involucrados en la susceptibilidad al melanoma mediante una aproximación al mapeo por mestizaje.
- e) Estudiar la correlación entre los factores ambientales con los factores genéticos en la etiología de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para este trabajo se aplicó la estrategia de casos - control. Para esto se tomó una muestra de 100 individuos afectados por melanoma cutáneo y 109 individuos controles. La toma de los pacientes con melanoma cutáneo fue llevada a cabo por el Servicio de Oncología y la Cátedra de Dermatología del hospital de Clínicas. La toma de los individuos control fue de aquellas personas que concurrían al Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Clínicas de la UdelaR, y que no tenían un historial familiar de cáncer, ni están emparentados con las personas de la muestra de pacientes. A cada participante del proyecto se le extrajo una muestra de sangre de 3ml y se le realizó una encuesta, la cual incluye información acerca su historia de vida (dieta, exposición solar, trabajo), historia clínica (resultado de biopsias, medicación) y de su ancestralidad. Además se les informó acerca de los alcances de dicho estudio y se les pidió firmar un consentimiento informado. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (exp N° 071140-000569-08) en la resolución del Consejo de la Facultad de Medicina de fecha 18 de Junio del 2008.

EXTRACCIÓN DE ADN Y ELECCIÓN DE LOS MIAS

La extracción de ADN se realizó a partir de 3 ml de sangre periférica y se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Genética en la Facultad de Medicina mediante un sistema comercial FlexiGene DNA Kit de Qiagen.

Para este proyecto se eligieron 61 MIAs tomados de Fejerman y col (2008) y de Bonilla y col (2004c) para conformar un panel que cubra los 22 cromosomas autosómicos (ver tabla 1). Estos marcadores son sistemas bialélicos, dentro de los cuales se encuentran aquellos marcadores generados por un cambio en una base nucleotídica (SNP) y también las inserciones Alu.

GENOTIPADO DE MIAS Y MC1-R

Todos los análisis de laboratorio fueron realizados en el Laboratorio de Epidemiología Genética del Departamento de Genética, Facultad de Medicina y en el Laboratorio de Genética Humana de la UCIM (Unidad Central de Investigación Médica) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Los marcadores SLC24A5 (rs 1426654), TSC111025 (rs 2065160) y GC1F (rs NA), y las mutaciones R151C (rs1805007), R160W (rs1805008), D294H (rs1805009) del gen MC1-R fueron genotipados mediante el kit comercial de SNaPshot Multiplex System de Applied Biosystems según las recomendaciones del fabricante. El SNaPshot es una técnica que se basa en una extensión alelo específica o en una minisequenciación de un cebador adyacente al sitio que contiene al SNP, dicho método permite detectar hasta 10 SNPs en una misma reacción (ver Anexo II).

Previo a la reacción de SNaPshot se amplificó por PCR multiplex los tres marcadores utilizando los cebadores descritos por Bonilla y col (2004c).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 15 μ l.

| | |
|--|---------------|
| Buffer 10X | 1.5 μ l |
| MgCl ₂ 50mM | 1.2 μ l |
| dNTPs 10mM | 0.3 μ l |
| Cebadores SLC24A5 F y R 25 μ M | 0.12 μ l |
| Cebadores TSC111025 F y R 25 μ M | 0.12 μ l |
| Cebadores GC1F F y R 25 μ M | 0.24 μ l |
| Agua destilada | 10.66 μ l |
| Taq polimerasa Platinum (Invitrogen) 5U/ μ l | 0.12 μ l |

ADN molde

1 μ l

Esta reacción fue llevada a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems en las siguientes condiciones:

| | | | |
|------|------|--------|-----------|
| 95°C | ———— | 10 min | |
| 95°C | ———— | 30seg | 35 ciclos |
| 56°C | ———— | 30seg | |
| 72°C | ———— | 40seg | |
| 72°C | ———— | 5min | |

Para el gen MC1-R, se amplificó su región codificante mediante el uso de los cebadores descritos en el anexo I. La reacción de PCR del gen MC1-R fue la siguiente:

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| Buffer 10X | 1.5 μ l |
| MgCl ₂ 50 mM | 0.6 μ l |
| dNTPs 10 mM | 0.3 μ l |
| Cebador MC1-R (D) 25 μ M | 0.15 μ l |
| Cebador MC1-R (R) 25 μ M | 0.15 μ l |
| DMSO | 1.5 μ l |
| Taq polimerasa Platinum (Invitrogen) | 0.15 μ l |

| | |
|----------------|--------------|
| Agua destilada | 9.65 μ l |
| ADN molde | 1 μ l |

Para esta reacción el ciclado fue el siguiente que se detalla a continuación:

| | | |
|------|--------|----------|
| 95°C | 5min. | |
| 95°C | 30seg. | 35ciclos |
| 58°C | 30seg. | |
| 72°C | 1min. | |
| 72°C | 5min. | |

Se mezclaron 2 μ l de cada producto de PCR y se purificaron mediante reacción enzimática

| | |
|---------------------------|-------------|
| 1 unidad de SAP | 1 μ l |
| 4 unidades de <i>ExoI</i> | 0.2 μ l |

Se incubó a 37°C una hora y luego se inactiva la enzima durante 15min a 85°C.

Este producto se guarda a -20°C hasta su utilización en la reacción de SNaPshot.

Las reacciones de SNaPshot se realizaron mezclando dos productos de PCR, uno correspondiente al multiplex de los 3 marcadores SLC24A5, TSC111025 y GC1F y el otro al PCR del MC1-R, luego se siguen las condiciones establecidas en el protocolo del kit con las modificaciones descriptas por Le Hellard y col (2002). En la reacción de SNaPshot se utilizan 2 μ l del mix de reacción en vez de los 5 μ l recomendados por el fabricante y se

adiciona a esa reacción 1 µl de un buffer term, el cual está compuesto por 200mM de Tris-HCl pH 9 y 5mM de MgCl₂ (ver Anexo 2).

Los cebadores internos para llevar a cabo la reacción de SNaPshot se diseñaron utilizando el programa m-fold (ZUKER 2003) (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold) y corresponden a una mezcla de 0.2µM de los oligos SLC24A5sn, TSC111025sn, GC1Fsn, R151Csn, R160Wsn y D294Hsn (ver Anexo 1). Los mismos se diseñaron de forma tal que terminen en el extremo 5´del SNP, no formen dímeros y difieran entre sí por al menos 4 pb. Cebadores de la misma longitud detectan distintas nucleótidos, lo que permite distinguirlo por colores diferentes. Una vez finalizada la reacción se corrieron los productos en un secuenciador automático de 4 capilares ABI3130 (Applied Biosystems) en el Instituto Pasteur de Montevideo utilizando el polímero POP-4. El análisis de los picos obtenidos se realizó mediante el software Peak ScannerTM software v1.0 de Applied Biosystems (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab>). Para validar los resultados del genotipado de SLC24A5, TSC111025 y GC1F, obtenidos por SNaPshot, se realizó un PCR-RFLP. Se utilizó el producto de PCR multiplex de los 3 MIAs previamente mencionados y se digirió con las correspondientes enzimas de restricción. Para genotipar SLC24A5 se utilizó la enzima *HhaI* de Fermentas y para genotipar TSC111025 y GC1F se digirió con la enzima de restricción *HAEIII* de Fermentas (ver Anexo II). Los productos de digestión fueron corridos en un gel de acrilamida al 6% en buffer TBE 0.5X a 100V, y teñido con AgNO₃ (Ver anexo II).

Para la determinación de APOA1 (rs 3138522) y PV92 (rs 3138523) (ambos son inserciones ALU) se realizó un PCR bajo condiciones específicas en un volumen final de 15 µl.

| | |
|--------------------------|--------|
| Buffer 10X | 1.5µl |
| dNTP 10mM | 0.2 µl |
| Cebador Directo (D) 25µM | 0.3 µl |
| Cebador Reverso (R) 25µM | 0.3 µl |

| | |
|--|----------|
| Taq polimerasa (U-Taq con MgCl ₂)5U/μl | 0.15 μl |
| Agua destilada | 11.55 μl |
| ADN molde | 1μl |

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Las condiciones de ciclado fueron las mismas para ambos marcadores.

| | | |
|------|--------|-----------|
| 95°C | 5min. | |
| 94°C | 30seg. | 35 ciclos |
| 53°C | 40seg. | |
| 72°C | 40seg. | |
| 72°C | 5min. | |

Los cebadores flanquean la región de la inserción Alu tanto para el caso de PV92 como para APOA1. Los productos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de Etidio para su visualización mediante luz ultravioleta. Para PV92 la inserción deja un fragmento de 443 pb y sin inserción se observa un fragmento de 129 pb. Para APOA1 la inserción deja un fragmento de 400pb y sin inserción se observa un fragmento de 97 pb. Para la corrida electroforética se utilizó como marcador de peso molecular una escalera de 100 pb de Invitrogen y tanto controles positivos como negativos.

Por otra parte para estudiar a los restantes 56 marcadores, los cuales son todos SNPs, se analizaron en Kbiosciences (Hoddesdon Herts, UK) mediante la técnica de Kaspar SNP Genotyping System. Este sistema es una variante de Taqman, que utiliza PCR real-time y oligonucleótidos alelo específicos marcados.

ANÁLISIS DE MC1-R

Además de estudiar las tres mutaciones del MC1-R asociadas a la pigmentación de la piel (R151C R160W y D294H), se estudiaron 5 tag- SNPs tomados de Ibarrola y col (2010), que están localizados en la región 5' y 3'UTR y en la región promotora de dicho gen (ver figura 8), mediante la técnica Kaspar SNP Genotyping System KBiosciences (Hoddesdon Herts, UK) (<http://www.kbioscience.co.uk/>) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se armaron dos bloques para compararlos con la población española, los mismos fueron obtenidos utilizando la información de la población europea del HapMap (CEU). Dichos bloques se consideraron para todas las poblaciones analizadas.

La técnica de genotipado utilizada fue llevada a cabo en colaboración con la Dra. Gloria Ribas del laboratorio de Genética Humana de la UCIM (Unidad Central de Investigación Médica) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

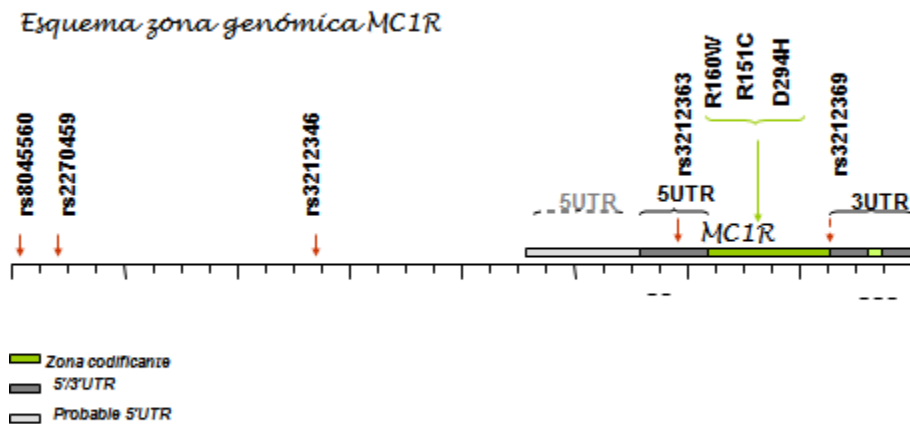


Figura 8. Esquema del gen MC1-R y sus variantes localizadas en la región codificante, región promotora y regiones 5' y 3' UTR.

SECUENCIACIÓN DEL MC1-R

Para confirmar los resultados obtenidos del SNaPshot para las tres mutaciones RHC estudiadas del gen MC1-R y poder detectar otras mutaciones ya descritas y mutaciones nuevas características de la población uruguaya, se secuenció la región codificante del gen (1020 pb) MC1-R en 22 casos y en 24 controles (ver anexo III) en MacroGen Advancing Through Genomics (www.macrogen.com).

El análisis de las secuencias fue realizado en el programa Bioedit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), y la consecuencia de las mutaciones nuevas encontradas en la estructura de la proteína fue evaluada mediante el programa SNPs3D Home (www.SNPs3d.org). Dicho programa predice si un cambio en una base podría afectar la función de la proteína basado en una homología de secuencia y en las propiedades físicas de los aminoácidos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS:

Para llevar a cabo el análisis de mestizaje de nuestra población se determinaron los aportes de las 3 poblaciones parentales (europeos, africanos y amerindios) en la población uruguaya mediante la utilización de los 56 MIAs estudiados con el programa Structure 2.3.3 (FALUSH *et al.* 2003; PRITCHARD *et al.* 2000). Los parámetros utilizados para llevar a cabo la corrida en el programa fueron: duración del período *burning*: 10000 y el número de réplicas fue de 15000, se utilizó como modelo de ancestralidad el modelo de mestizaje (Admixture model). Además se utilizó un modelo de frecuencias independientes entre sí para cada una de las poblaciones. Por otra parte para verificar que no exista una subestructuración dentro de la muestra de casos y controles se utilizó nuevamente el programa Structure con los mismos parámetros previamente mencionados. Para calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de los MIAs estudiados se utilizó un programa del Instituto de Oncología de Cataluña denominado SNPSTATs (SOLE *et al.* 2006). Este es un

software que ha sido diseñado para analizar estudios epidemiológicos de asociación usando SNPs. Este programa permite analizar el equilibrio Hardy-Weinberg, y la asociación de cada SNP con la variable respuesta (estado). Además la inclusión del mestizaje como covariante también fue realizada mediante este programa agregando como covariable el mestizaje individual. Por otro lado para determinar los haplotipos del MC1R y determinar si existe asociación entre estos y el melanoma se utilizó el programa Haploview 4.2 (BARRETT *et al.* 2005).

Se utilizó el programa Epiinfo v3.5 (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>) con el fin de calcular las asociaciones entre las variables fenotípicas y el riesgo a desarrollar la enfermedad. Además se construyó un modelo basado en una regresión logística, en el cual se pretende estudiar cuales son los factores tanto genéticos como ambientales que predisponen al desarrollo de un melanoma maligno. Las variables independientes son las variables fenotípicas fototipo, presencia de nevos, exposición solar, y PV92 como marcador relacionado a la presencia del MM. La variable respuesta o dependiente es el estado (caso o control). Los valores de asociación fueron corregidos por la ancestralidad individual utilizando al mestizaje como covariable dentro del modelo de regresión logística previamente mencionado. Dicho análisis se realizó en el programa R (<http://cran.r-project.org/>).

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra la información relacionada a los 61 marcadores informativos de ancestralidad (MIAs) utilizados. En la misma se muestra la localización cromosómica de cada marcador y la frecuencia parental africana, europea y amerindia para cada MIA.

Tabla 1. Información genética resumida de los MIAs estudiados

| MIAs | Cromosoma | africanos | europeos | amerindios |
|----------------|-----------|-----------|----------|------------|
| rs1934393 (C) | 1 | 0,22 | 0,84 | 0,3 |
| rs2817611 (C) | 1 | 0,27 | 0,95 | 0,96 |
| rs3828121 (A) | 1 | 1 | 0,87 | 0,3 |
| rs6684063 (A) | 1 | 0,22 | 0,83 | 0,16 |
| rs2065160 (T) | 1 | 0,487 | 0,921 | 0,137 |
| rs10498255 (A) | 2 | 0,25 | 0,81 | 0,97 |
| rs1470524 (C) | 2 | 0,22 | 0,79 | 0,53 |
| rs3860446 (A) | 2 | 0,97 | 0,36 | 1 |
| rs842634 (C) | 2 | 0,97 | 0,74 | 0,23 |
| rs868179 (A) | 2 | 0,97 | 0,07 | |
| rs1395771 (C) | 3 | 0,97 | 0,02 | 0,57 |
| rs1984473 (C) | 3 | 0,97 | 0,63 | 0,97 |
| rs6804094 (A) | 3 | 0,97 | 0,65 | 0,13 |
| rs9310888 (C) | 3 | 0,97 | 0,075 | 0 |
| GC1F | 4 | 0,97 | 0,156 | 0,339 |
| rs1398829 (A) | 4 | 0,97 | 0,98 | 1 |
| rs9307613 (A) | 4 | 0,97 | 0,78 | 0,83 |
| rs10515535 (A) | 5 | 0,97 | 0,29 | 0,13 |
| rs257748 (A) | 5 | 0,97 | 0,38 | 0,96 |
| rs10484578 (A) | 6 | 0,97 | 0,38 | 0,07 |
| rs6569792 (A) | 6 | 0,97 | 0,68 | 0,8 |
| rs6911727 (A) | 6 | 0,97 | 0,48 | 1 |
| rs9320808 (A) | 6 | 0,97 | 0,096 | 0,97 |
| rs10214949 (A) | 7 | 0,97 | 0,84 | 0,97 |
| rs10486576 (A) | 7 | 0,97 | 0,9 | 0,2 |
| rs4733652 (T) | 8 | 0,97 | 0,24 | 0,83 |

| MIAs | Cromosoma | africanos | europeos | amerindios |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| rs9325872 (A) | 8 | 0,94 | 0,32 | 1 |
| rs10491654 (A) | 9 | 0,5 | 0,29 | 0,9 |
| rs4013967 (C) | 9 | 0,06 | 0,65 | 1 |
| rs10508349 (A) | 10 | 0,06 | 0,012 | 0,77 |
| rs1397618 (A) | 10 | 0,29 | 0,95 | 1 |
| rs10501474 (C) | 11 | 0,06 | 0,64 | 0,8 |
| rs879780 (C) | 11 | 0,67 | 0,05 | |
| rs948360 (C) | 11 | 0,25 | 0,97 | 1 |
| rs3138522 (ins) | 11 | 0,420 | 0,917 | 0,977 |
| rs4034627 (A) | 12 | 0,78 | 0,05 | 0,03 |
| rs4076700 (A) | 12 | 0,21 | 0,83 | 0,9 |
| rs4762106 (C) | 12 | 0,81 | 0,09 | 0,67 |
| rs10492585 (A) | 13 | 0,1 | 0,94 | 1 |
| rs2585901 (C) | 13 | 0,76 | 0,85 | 0,067 |
| rs10131076 (A) | 14 | 0,69 | 0,07 | |
| rs1451928 (A) | 14 | 0,86 | 0,86 | 0,2 |
| rs9323178 (A) | 14 | 0,18 | 0,45 | 0,97 |
| rs10520678 (C) | 15 | 0,15 | 0,73 | 1 |
| rs9302185 (C) | 15 | 0,88 | 0,19 | 0,03 |
| rs1426654 (G) | 15 | 0,013 | 1 | |
| rs1004704 (A) | 16 | 0,02 | 0,21 | 0,87 |
| rs10500505 (A) | 16 | 0,06 | 0,21 | 0,8 |
| rs30125 (C) | 16 | 0,64 | 0,05 | 0,1 |
| rs3138523 (ins) | 16 | 0,225 | 0,171 | 0,792 |
| rs4130513 (A) | 16 | 0,72 | 0,08 | 0,19 |
| rs10491097 (C) | 17 | 0,06 | 0,65 | 0,13 |
| rs2253624 (G) | 17 | 0,18 | 1 | 1 |
| rs1013459 (A) | 18 | 0,23 | 0,9 | 0,97 |
| rs12953952 (C) | 18 | 0,14 | 0,93 | 0,97 |
| rs798887 (A) | 19 | 0,78 | 0,85 | 0,13 |
| rs888861 (A) | 19 | | 0,74 | 0,9 |
| rs2208139(A) | 20 | 0,83 | 0,67 | 0,03 |
| rs708915 (A) | 20 | 0,74 | 0,1 | 0,73 |
| rs2829454 (C) | 21 | 0,06 | 0,27 | 0,93 |
| rs138022 (A) | 22 | 0,83 | 0,26 | 0,03 |

Tabla 2. Caracterización de la muestra de estudio según las características ambientales y fenotípicas de los individuos.

| | Melanoma (N= 100) | Controles (N=109) | p-valor | OR (IC 95%) |
|---|-------------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| Sexo, n (%) | | | >0.5 | 1.01 (0.54-1.89) |
| <i>Femenino</i> | 60 (60) | 66 (60.55) | | |
| <i>Masculino</i> | 40 (40) | 43 (39.44) | | |
| Edad (años) | | | 0.0030 | |
| Media (DE) | 56.59 (14.99) | 62.38 (12.52) | | |
| Fototipo, n (%) | | | 0.0000 | 5.84 (2.88-11.83) |
| <i>I y II</i> | 64 (64) | 17 (15.59) | | |
| Nevos congénitos, n(%) | | | 0.0202 | 2.88 (1.14-7.33) |
| <i>SI</i> | 21 (21) | 10 (9.17) | | |
| <i>NO</i> | 79 (79) | 99 (90.82) | | |
| Nevos atípicos, n (%) | | | 0.0000 | 10.11 (4.09-24.92) |
| <i>SI</i> | 48 (48) | 4 (3.66) | | |
| <i>NO</i> | 52 (52) | 105 (96.33) | | |
| Antecedentes de nevos atípicos, n(%) | | | 0.0001 | 4.60 (2.01-10.51) |
| <i>SI</i> | 41 (41) | 12 (11.0) | | |
| <i>NO</i> | 59 (59) | 97 (88.99) | | |
| Exposición solar | | | | |
| exposición solar a los 15 años | | | 0.1947 | 1.38 (0.74-2.57) |
| exposición vacacional a los 15 años | | | 0.0010 | 2.76 (1.44-5.28) |
| exposición solar en la adultez | | | 0.4189 | 1.12 (0.59-2.13) |
| exposición solar vacacional en la adultez | | | 0.0150 | 2.09 (1.12-3.93) |
| Quemaduras solares, n(%) | | | | |
| antes de los 10 años | | | 0.0008 | 4.92 (1.83-13.24) |
| entre 10-15 años | | | 0.0002 | 4.13 (1.86-9.17) |
| entre 15-20 años | | | 0.0404 | 1.93 (0.98-3.78) |
| mayor a los 20 años | | | 0.0384 | 2.037 (0.99-4.18) |
| Nevos congénitos, n (%) | | | 0.0496 | |
| <10 | 20 (20) | 11 (10) | | |
| >10 | 1 (1) | 0 (0) | | |
| 0 | 79 (79) | 95 (87.15) | | |
| Nevos adquiridos, n(%) | | | 0.0003 | |
| <5mm | 84 (84) | 80 (73) | | |
| >5mm | 9 (9) | 1 (0.9) | | |
| 0 | 7 (7) | 28 (25.68) | | |
| Número de nevos adquiridos | | | 1.27E-08 | |
| Media (DE) | 30.63 (26.66) | 16.63 (15.26) | | |
| Número de Nevos atípicos, n (%) | | | 0.0000 | |
| 0 | 53 (53) | 102 (93.57) | | |
| 1-10 | 36 (36) | 7 (6.42) | | |
| 11-25 | 9 (9) | 0 (0) | | |
| 26-35 | 2 (2) | 0 (0) | | |

En la tabla 2 se muestra la relación que existe entre las variables fenotípicas y ambientales con el riesgo a desarrollar MM. Dentro de los fenotipos medidos en la piel encontramos que los fototipos I y II (que incluye a los individuos que tienen una piel fotosensible, con un color de pelo y de ojos claros) representa un factor de riesgo con un valor de p altamente significativo ($p=1E-5$, $OR=5.84$). Además la exposición solar vacacional a los 15 años y en la adultez también mostraron una asociación significativa con el riesgo al MM ya que sus valores fueron los siguientes: $p=1E-3$, $OR=2.76$ y $p=1E-2$, $OR=2.09$ respectivamente. También las quemaduras solares antes de los 10 años y entre 10-15 años, constituyó un factor de riesgo importante para el desarrollo del MM, ya que mostró valores altamente significativos con el riesgo a padecer la enfermedad ($p=8E-4$, $OR=4.92$ y $p=2E-4$, $OR=4.13$ respectivamente). Sin embargo las quemaduras solares después de los 15 años, si bien mostró valores de p levemente significativos ($p=4E-2$), el IC incluyó el 1, por lo que este valor no es realmente significativo y por lo tanto esta variable no se considera un factor de riesgo para el MM. Con respecto a los nevos atípicos, su presencia, número e incluso la presentación de nevos atípicos en la familia (historia familiar) son también factores de riesgo significativos ($p=1E-5$, $OR=10.11$; $p=1E-5$; $p=1E-4$, $OR=4.60$ respectivamente) del MM. La presencia de nevos congénitos y el número de éstos también mostró ser un factor de riesgo significativo ($p=2E-2$, $OR=2.88$ y $p=0.0496$). Además la presencia de nevos adquiridos durante la vida de los individuos y el número de estos, también son un factor de riesgo al MM ($p=3E-4$, $p=1.27E-8$ respectivamente). La edad también mostró una diferencia significativa entre los casos y los controles ($p=3E-3$), pero esto se puede deber en parte a que la muestra de los individuos control es mayor que la de los casos afectados por melanoma y eso conlleva a reclutar más controles dispares en edad respecto a los casos.

ANCESTRALIDAD EN LA POBLACIÓN URUGUAYA

Tabla 3. Análisis de abuelos paternos y maternos dentro de la población uruguaya (casos y controles).

| Lugar de nacimiento | Casos (%) | Controles (%) |
|-----------------------------|------------------|----------------------|
| Europa ¹ | 36.6 | 17.2 |
| Latino America ² | 46.1 | 63.7 |
| Desconocido | 17.3 | 19.1 |
| Total abuelos | 360 | 408 |

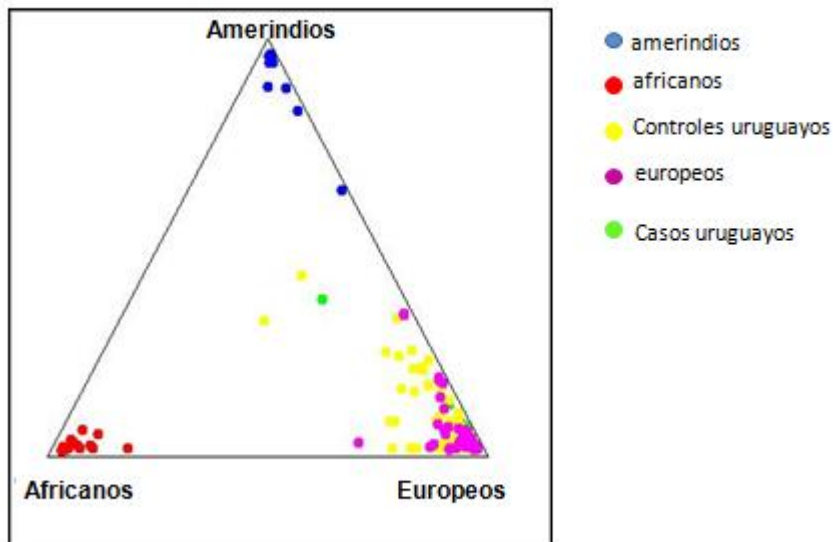
¹Este grupo provienen del Sur, Este y Norte de Europa. ²Este grupo pertenece a Uruguayos, Argentinos y Brasileños.

En una primera aproximación se analizó la presencia de ancestros de diferente origen geográfico entre los casos y controles. Se contó manualmente cuantos abuelos nacidos en Europa, Latinoamérica y otros países habían en la historia familiar de los participantes del proyecto. La tabla 3 muestra que en los pacientes aparece un exceso de ancestralidad europea en comparación con los individuos control (36.6% vs 17.2% respectivamente). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=1E-6$). También se vio que tanto en casos como en controles la abuelidad latinoamericana fue la mayoritaria. Para el resto de los abuelos se desconoce su origen.

Tabla 4. Medición de la ancestralidad general en la población uruguaya

| Población parental | Casos | Controles |
|---------------------------|--------------|------------------|
| Europeos | 0.924 | 0.876 |
| nativoamericanos | 0.047 | 0.075 |
| africanos | 0.029 | 0.049 |

La tabla 4 muestra los aportes de las poblaciones parentales en la muestra de pacientes y controles resultado del programa estadístico Structure utilizando 56 MIAs. Estos resultados muestran que la componente europea es la mayoritaria tanto en casos como en los controles (92.4% vs. 87.6% respectivamente). El componente que le sigue en porcentaje es el nativoamericano para ambas muestras (4.7% vs 7.5%) y el minoritario fue el africano (2.9 % en los casos vs. 4.9% en los controles).



A modo más gráfico, en la siguiente figura 9 se muestra el análisis de mestizaje para la muestra de casos y controles. Se observa que tanto los casos como los controles tienden a asemejarse más a la población europea en comparación a las otras dos poblaciones parentales (africanos y amerindios) ya que ambas muestras aparecen agrupadas con los individuos de la población europea. Sin embargo la población uruguaya por tener una estructura trihíbrida también presentó algunos individuos con una contribución menor de las otras dos poblaciones parentales (africanos y amerindios).

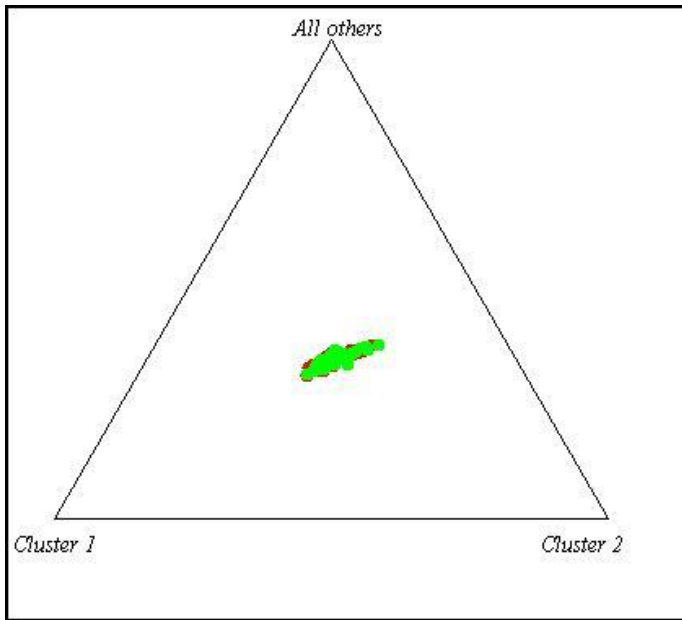


Figura 10. Gráfico obtenido del Structure donde se muestra si existe subestructuración en la muestra tomada entre casos y controles empleando tres poblaciones parentales ($k=3$).

Finalmente, con el fin de determinar si existía subestructuración en nuestra muestra, se analizó como dos subpoblaciones a los casos y controles, los cuales se visualizan con los colores rojo y verde. En esta figura se muestra el gráfico de 3 contribuciones parentales para los casos y controles uruguayos. A través del gráfico se observa que las dos subpoblaciones, correspondientes a los casos y a controles uruguayos, fueron genéticamente homogéneas, ya que se visualizaron como dos poblaciones superpuestas entre sí.

ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS MIAs CON EL RIESGO AL MELANOMA ESPORÁDICO

Tabla 5. Asociación de los MIAs con el riesgo a melanoma esporádico

| rs | alelo | N | MAF casos | MAF controles | HWE | OR (IC 95%) | p-valor | p-valor corregido por mestizaje |
|-------------------|-------|-----|-----------|---------------|-------|------------------|--------------|---------------------------------|
| rs1004704 | A | 236 | 0.16 | 0.23 | 1 | 1.84 (0.79-4.27) | 0.140 | 0.032 |
| rs10131076 | A | 240 | 0.09 | 0.12 | 0.28 | 1.64 (0.58-4.62) | 0.330 | 0.360 |
| rs1013459 | G | 240 | 0.20 | 0.13 | 1 | 0.60 (0.27-1.37) | 0.170 | 0.300 |
| rs10214949 | G | 246 | 0.10 | 0.12 | 0.27 | 1.16 (0.44-3.02) | 0.730 | 0.820 |
| rs10484578 | A | 238 | 0.33 | 0.46 | 0.81 | 2.60 (1.14-5.92) | 0.015 | 0.067 |
| rs10486576 | G | 242 | 0.15 | 0.13 | 0.6 | 1.03 (0.44-2.37) | 0.900 | 0.032 |
| rs10491097 | T | 242 | 0.31 | 0.33 | 0.59 | 1.02 (0.47-2.22) | 0.850 | 0.830 |
| rs10491654 | A | 242 | 0.30 | 0.33 | 0.79 | 0.97 (0.46-2.05) | 0.840 | 0.490 |
| rs10492585 | G | 248 | 0.08 | 0.09 | 1 | 1.18 (0.45-3.06) | 0.740 | 0.010 |
| rs10498255 | G | 248 | 0.22 | 0.30 | 1 | 1.72 (0.80-3.71) | 0.140 | 0.610 |
| rs10500505 | A | 242 | 0.29 | 0.21 | 0.5 | 0.88 (0.40-1.92) | 0.410 | 0.130 |
| rs10501474 | T | 240 | 0.32 | 0.35 | 0.31 | 1.10 (0.5-2.41) | 0.710 | 0.010 |
| rs10508349 | A | 246 | 0.03 | 0.06 | 1 | 2.20 (0.57-8.58) | 0.230 | 0.051 |
| rs10515535 | G | 248 | 0.55 | 0.47 | 0.35 | 0.94 (0.40-2.21) | 0.690 | 0.310 |
| rs10520678 | T | 242 | 0.19 | 0.21 | 1 | 1.27 (0.57-2.81) | 0.570 | 0.028 |
| rs12953952 | T | 246 | 0.08 | 0.03 | 0.041 | 0.15 (0.03-0.74) | 0.024 | 0.440 |
| rs138022 | A | 240 | 0.28 | 0.27 | 1 | 1.20 (0.55-2.64) | 0.860 | 0.470 |
| rs1395771 | C | 244 | 0.05 | 0.11 | 1 | 2.21 (0.74-6.60) | 0.100 | 0.440 |
| rs1397618 | T | 246 | 0.07 | 0.07 | 1 | 0.98 (0.34-2.76) | 0.960 | 0.590 |
| rs1398829 | T | 250 | 0.04 | 0.07 | 0.27 | 1.39 (0.40-4.90) | 0.470 | 0.440 |
| rs1451928 | C | 240 | 0.16 | 0.26 | 1 | 1.68 (0.76-3.71) | 0.110 | 0.096 |
| rs1470524 | T | 244 | 0.19 | 0.27 | 0.76 | 1.23 (0.57-2.65) | 0.350 | 0.850 |
| rs4733652 | T | 250 | 0.20 | 0.24 | 0.75 | 1.67 (0.74-3.79) | 0.290 | 1.000 |
| rs4762106 | C | 244 | 0.24 | 0.31 | 0.79 | 1.42 (0.67-3.02) | 0.270 | 0.230 |
| rs6569792 | G | 246 | 0.25 | 0.34 | 0.61 | 1.19 (0.55-2.53) | 0.340 | 0.760 |
| rs6684063 | C | 236 | 0.28 | 0.27 | 0.37 | 1.04 (0.47-2.32) | 0.970 | 0.140 |
| rs6804094 | T | 250 | 0.33 | 0.31 | 0.015 | 0.43 (0.20-0.92) | 0.140 | 0.450 |
| rs6911727 | G | 238 | 0.40 | 0.42 | 0.81 | 0.93 (0.41-2.10) | 0.980 | 0.420 |
| rs708915 | A | 244 | 0.27 | 0.26 | 1 | 0.99 (0.46-2.13) | 0.890 | 0.390 |
| rs798887 | G | 246 | 0.28 | 0.26 | 0.56 | 1.47 (0.65-3.32) | 0.680 | 0.260 |

Continuación

| rs | alelo | N | MAF casos | MAF controles | HWE | OR (IC 95%) | p-valor | p-valor corregido por mestizaje |
|------------------|-------|-----|-----------|---------------|--------|------------------|--------------|---------------------------------|
| rs842634 | T | 244 | 0.24 | 0.18 | 0.68 | 0.65 (0.29-1.43) | 0.230 | 0.028 |
| rs868179 | A | 240 | 0.06 | 0.10 | 1 | 1.84 (0.66-5.15) | 0.230 | 0.018 |
| rs879780 | C | 244 | 0.11 | 0.11 | 0.59 | 0.93 (0.39-2.22) | 0.870 | 0.490 |
| rs888861 | G | 246 | 0.38 | 0.37 | 0.45 | 0.91 (0.42-1.99) | 0.830 | 0.540 |
| rs9302185 | C | 250 | 0.18 | 0.20 | 0.47 | 1.31 (0.57-2.99) | 0.590 | 0.032 |
| rs9307613 | A | 236 | 0.40 | 0.43 | 1 | 1.61 (0.70-3.69) | 0.370 | 0.730 |
| rs9310888 | C | 250 | 0.14 | 0.13 | 1 | 0.95 (0.33-2.67) | 0.920 | 0.540 |
| rs9320808 | A | 246 | 0.19 | 0.27 | 0.24 | 2.08 (0.96-4.49) | 0.066 | 0.710 |
| rs9323178 | G | 240 | 0.43 | 0.48 | 0.64 | 2.05 (0.87-4.82) | 0.150 | 0.710 |
| rs1934393 | G | 244 | 0.27 | 0.29 | 1 | 0.86 (0.41-1.81) | 0.970 | 0.540 |
| rs1984473 | T | 244 | 0.41 | 0.36 | 0.81 | 1.73 (0.75-3.98) | 0.680 | 0.420 |
| rs2208139 | T | 242 | 0.59 | 0.49 | 0.64 | 1.74 (0.73-4.12) | 0.130 | 0.010 |
| rs2253624 | T | 248 | 0.03 | 0.07 | 0.28 | 1.93 (0.49-7.66) | 0.240 | 0.067 |
| rs257748 | A | 236 | 0.42 | 0.44 | 0.81 | 0.72 (0.31-1.65) | 0.670 | 0.350 |
| rs2585901 | T | 248 | 0.18 | 0.35 | 0.80 | 2.43 (1.10-5.37) | 0.007 | 0.200 |
| rs2817611 | T | 246 | 0.09 | 0.10 | 0.5 | 1.20 (0.44-3.30) | 0.790 | 0.290 |
| rs2829454 | C | 236 | 0.30 | 0.29 | 0.77 | 0.87 (0.41-1.88) | 0.750 | 0.140 |
| rs30125 | C | 244 | 0.11 | 0.15 | 0.047 | 1.10 (0.43-2.80) | 0.580 | 0.820 |
| rs3828121 | G | 250 | 0.13 | 0.12 | 0.59 | 1.37 (0.56-3.36) | 0.790 | 0.590 |
| rs3860446 | A | 246 | 0.42 | 0.37 | 0.45 | 0.87 (0.39-1.92) | 0.570 | 0.240 |
| rs4013967 | A | 244 | 0.29 | 0.31 | 0.59 | 1.13 (0.53-2.45) | 0.710 | 0.022 |
| rs4034627 | A | 238 | 0.06 | 0.06 | 1 | 0.92 (0.30-2.86) | 0.890 | 1.000 |
| rs4076700 | G | 244 | 0.15 | 0.24 | 0.34 | 1.96 (0.83-4.64) | 0.074 | 0.003 |
| rs4130513 | A | 248 | 0.09 | 0.09 | 1 | 0.93 (0.36-2.38) | 0.880 | 0.410 |
| rs9325872 | A | 246 | 0.33 | 0.44 | 1 | 1.41 (0.64-3.08) | 0.180 | 0.110 |
| rs948360 | T | 240 | 0.11 | 0.15 | 0.64 | 1.13 (0.47-2.69) | 0.590 | 0.096 |
| rs3138523 | + | 232 | 0.08 | 0.19 | 1 | 3.58 (1.34-9.60) | 0.002 | 1,00E-04 |
| rs3138522 | - | 234 | 0.08 | 0.05 | 1 | 0.70 (0.22-2.23) | 0.550 | 0.096 |
| rs2065160 | C | 214 | 0.19 | 0.32 | 0.13 | 2.87 (1.30-6.32) | 0.007 | |
| rs1426654 | G | 228 | 0.27 | 0.13 | 1 | 0.61 (0.27-1.39) | 0.240 | |
| GC1F | G | 214 | 0.42 | 0.50 | 0.0085 | 1.50 (0.57-4.0) | 0.410 | |

MAF: frecuencia del alelo minoritario

HWE: valor de las frecuencias alélicas para cada MIA en equilibrio Hardy Weinberg

La tabla 5 muestra la asociación entre los marcadores de ancestralidad y el melanoma esporádico. De los 61 MIAs estudiados, se observó que únicamente 5 de ellos mostraron asociación significativa con el riesgo al melanoma ($p < 0.05$) sin corregir por el mestizaje individual. Entre estos se encuentran el rs 10484578, rs 12953952, rs2585901, rs3138523 y rs2065150). Al realizar la corrección por el mestizaje individual 12 de ellos mostraron asociación estadísticamente significativa con la enfermedad (rs1004704, rs10486576, rs10492585, rs10501474, rs10520678, rs842634, rs868179, rs9302185, rs2208139,

rs4013967, rs4076700 y rs3138523) (p -valor < 0.05). Al realizar la corrección de Bonferroni a todos los marcadores únicamente el marcador rs 3138523 (PV92) sigue siendo significativo ($p= 0.0073$) (ver Anexo III). Este marcador que se halla en un intrón del gen CDH13, el cual codifica para la proteína caderina del corazón y está en una región cromosómica cercana al gen candidato del melanoma esporádico MC1-R (16q24.3), por lo que esto nos llevó a estudiar dicha región en mayor profundidad. Esta región también contiene otros genes que están relacionados indirectamente con el desarrollo del cáncer, estos son TUBB3, y FXBO31 (figura 11).

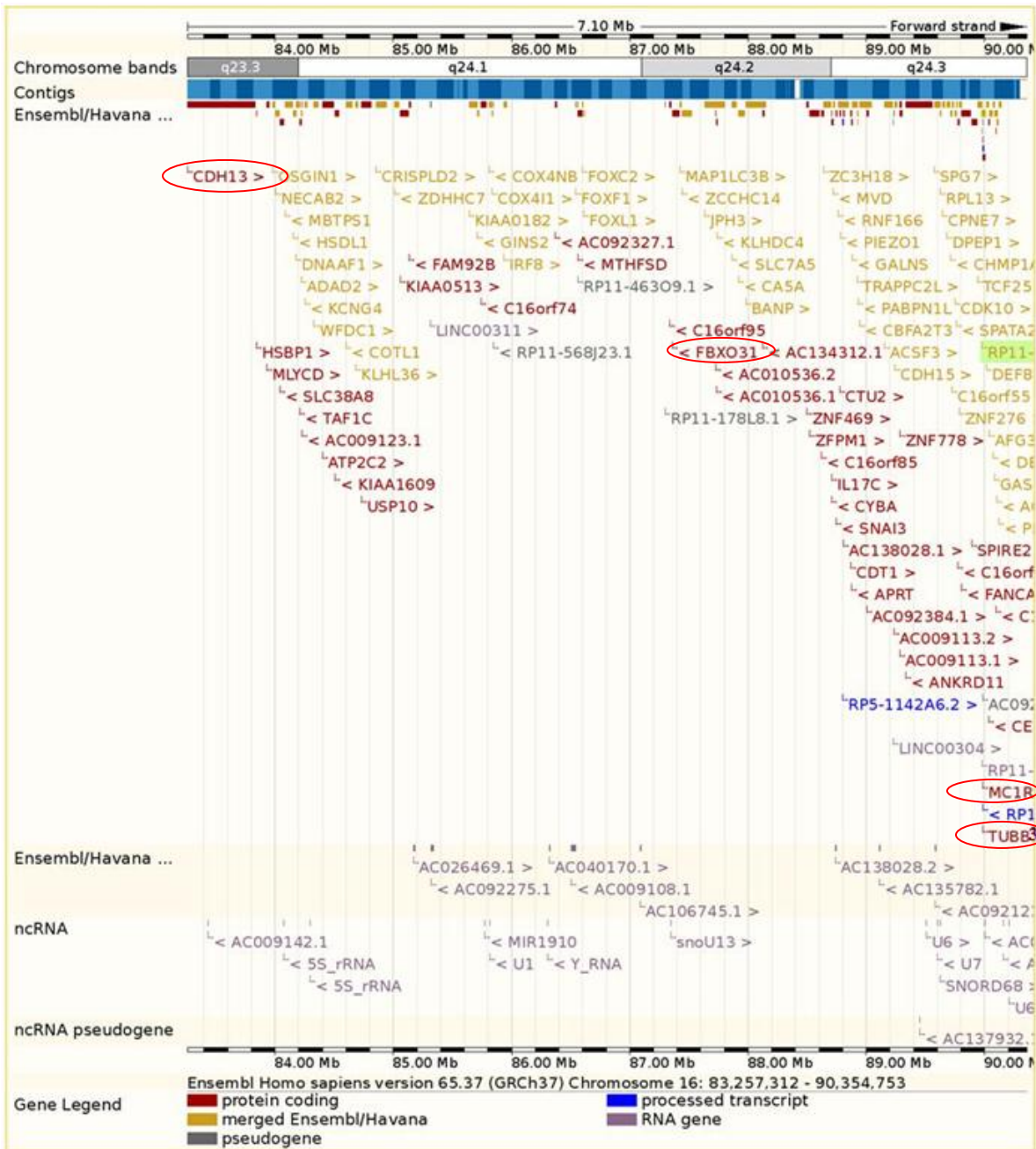


Figura 11. Esquema tomado del Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org) de la región cromosómica 16q señalando los genes estudiados CDH12, FXBO31, TUBB3 y MC1-R.

ASOCIACION DEL MC1-R Y EL RIESGO AL MM

Tabla 6. Asociación entre los variantes del gen MC1-R y el riesgo al melanoma

| Gen | rs | Alelo | N | MAF | | HWE | OR (IC 95%) | P-valor |
|-------|-----------|-------|-----|-----------|-----------|-------|-------------------|--------------|
| | | | | MAF casos | controles | | | |
| MC1-R | R151C | T | 226 | 0.03 | 0.01 | 1 | 0.25 (0.02-2.51) | 0.2 |
| | D294H | C | 224 | 0.01 | 0.02 | 1 | 2.49 (0.25-24.72) | 0.41 |
| | R160W | T | 226 | 0.05 | 0 | 1 | | 0.009 |
| | rs8045560 | T | 192 | 0.45 | 0.32 | 0.031 | 0.65 (0.31-1.36) | 0.081 |
| | rs2270459 | T | 198 | 0.03 | 0.04 | 1 | 1.23 (0.38-3.97) | 0.89 |
| | rs3212346 | A | 196 | 0.08 | 0.07 | 1 | 0.91 (0.35-2.36) | 0.74 |
| | rs3212363 | T | 198 | 0.33 | 0.31 | 0.34 | 0.94 (0.49-1.81) | 0.74 |
| | rs3212369 | G | 192 | 0.2 | 0.15 | 1 | 0.82 (0.34-1.96) | 0.65 |

Debido a que el marcador PV92 mostró una gran asociación con el riesgo al MM y este se encuentra muy cerca del gen MC1-R, que está implicado en la síntesis de la melanina y por ende con la pigmentación de la piel en humanos, es que se decidió estudiar al gen MC1-R y su región cromosómica en mayor profundidad. En la tabla 6 se muestra la asociación de las ocho variantes del gen MC1-R con el riesgo al MM. De todas las variantes estudiadas del gen solamente la mutación R160W mostró asociación significativa estadísticamente con dicha enfermedad ($p= 0.009$). Dicho valor de asociación no fue corregido por Bonferroni, si se lo hubiera corregido no daría significativo, por lo que se quiere señalar la tendencia e importancia de dicha mutación en el riesgo a MM. Para el resto de los SNPs no se detectó ninguna relación con el riesgo al MM pero sí se vio que todos los marcadores, excepto el rs 8045560, mostraron valores de equilibrio de H-W de 1 o cercanos a 1 ($HWE >0.05$), esto significa que estos SNPs fueron correctamente genotipados en nuestro estudio.

ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS DEL GEN MC1-R

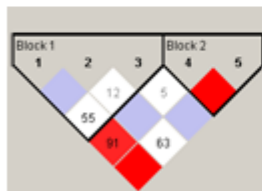
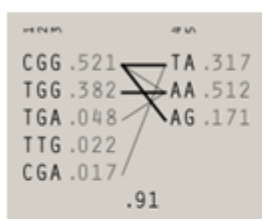
Tabla 7. Análisis de los haplotipos del gen MC1-R en la población uruguaya comparado con la población europea, asiática y africana del HapMap y con una población española (IBARROLA-VILLAVA *et al.* 2010).

| Haplotipos | Frecuencia HapMap (%) | | | Frecuencia Española (%) | | Frecuencia Uruguaya (%) | | Valor p de asociación |
|-----------------|-----------------------|---------------|-----------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| | Europeos | Africanos | | Casos españoles | Controles españoles | Casos uruguayos | Controles uruguayos | |
| | | Sub-Asiáticos | Asiáticos | | | | | |
| Bloque 1 | | | | | | | | |
| CGG | 44.0 | 52.7 | 61.3 | 32.2 | 33.2 | 52.1 | 58.1 | 1 |
| TGG | 48.4 | 3.6 | 16.7 | 59.0 | 59.4 | 38.2 | 33.9 | 0.12 |
| CTA | 6.4 | 22.7 | 20.8 | 5.7 | 6.5 | | 3.6 | 0.34 |
| CGA | | 20.9 | | | | 1.7 | 1.6 | 0.87 |
| TGA | | | | | | 4.8 | 1.6 | 0.17 |
| CTG | | | | | | | 1.3 | 0.21 |
| TTG | | | | | | 2.2 | | |
| Bloque 2 | | | | | | | | |
| AA | 54.8 | 3.5 | 13.1 | 58.1 | 56.2 | 51.2 | 54.3 | 1 |
| TA | 31.3 | 57.3 | 65.5 | 21.6 | 23.7 | 31.7 | 28.7 | 0.58 |
| AG | 13.7 | 39.2 | 21.4 | 20.3 | 19.9 | 17.1 | 17.0 | 0.87 |

Bloque 1 corresponde a la región promotora del gen.

Bloque 2 corresponde a la región 5' ÛTR y 3' UTR del gen.

Haplotipos de MC1-R en casos



Haplotipos de MC1-R en controles

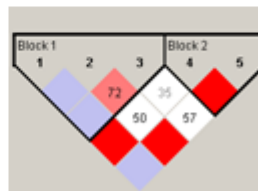
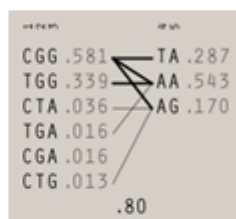


Figura 12. Esquema de los haplotipos del gen MC1-R para los casos y controles uruguayos.

La tabla 7 muestra los haplotipos de 5 tag-SNPs del MC1-R para las tres poblaciones tomadas del HapMap (europeas, africanas y asiáticas), para la población española (casos y controles) y para la población uruguaya (casos y controles). El bloque 1 corresponde a la región promotora de dicho gen y el bloque 2 corresponde a las regiones 5'UTR y 3'UTR (figura 12). Se construyeron estos dos bloques con el objetivo de comparar las frecuencias de los haplotipos de la población uruguaya con la población española.

Se detectaron 7 haplotipos en la población uruguaya para el bloque 1 (CGG, TGG, CTA, CGA, TGA, CTG, TTG). El haplotipo CGG fue el mayoritario en nuestra población (52.1% en los casos vs. 58.1% en los controles) y también en las poblaciones asiáticas y africanas tomadas del HapMap. El que le sigue en mayor frecuencia es el haplotipo TGG que está en un 38.2% en los casos y en 33.9% en los controles. Este es el más frecuente en las poblaciones europeas (48.4%) y en la española (59% y 59.4% en casos y controles respectivamente). El haplotipo CTA se encuentra en todas las poblaciones excepto en los casos uruguayos. Por otro lado el haplotipo CGA únicamente se halla presente en la población uruguaya (1.7% y 1.6% en casos y controles respectivamente) y en la población africana (20.9%). Además se encontraron 3 haplotipos nuevos para la población uruguaya que no estaban presentes en ninguna de las poblaciones parentales. Los mismos fueron los siguientes: el haplotipo TGA, el cual se halló en los controles (1.6%) y casos uruguayos (4.8%), el haplotipo TTG únicamente se lo encontró en los casos uruguayos (2.2%) y el haplotipo CTG en los controles uruguayos (1.3%) (tabla 7).

Para el haplobloque 2, que se refiere a la región genómica del gen MC1-R, se detectaron 3 haplotipos AA, TA y AG en todas las poblaciones. Los mismos estaban presentes en frecuencias similares a las europeas. El haplotipo AA fue el más frecuente para nuestra población (51.2% vs. 54.3% para casos y controles respectivamente) al igual que los españoles (58.1% vs 56.2% para casos y controles respectivamente) y europeos (54.8%). El haplotipo TA estaba presente en un 31.7% vs. 38.7% para los casos y controles uruguayos respectivamente, y en una frecuencia similar para las poblaciones españolas (21.6% vs, 23.7% casos y controles respectivamente) y europeas (31.3%). Finalmente el haplotipo AG en la población uruguaya fue el minoritario tanto en casos como en controles (17.1% vs. 17%) al igual que la población europea (13.7%) (Tabla 7).

Para ninguno de los haplotipos de ambos haplobloques se encontró asociación con el melanoma esporádico.

Por otro lado también se realizaron análisis de haplotipos incluyendo a 3 mutaciones RHC identificadas a lo largo de la región codificante del gen aparte de los 5 tag-SNPs previamente mencionados. Para la población uruguaya se encontró un haplotipo relativamente frecuente CGCCGGAA (18% en controles y 4% en casos). Dicho haplotipo podría ser interpretado como protector de la enfermedad (OR= 0.21, 95% IC 0.057 – 0.81) ya que este resulta de la combinación de los bloques 1 y 2 con los haplotipos más frecuentes en Uruguay y además es portador de las variantes normales RHC (Tabla 8).

Además, se vio que en el haplobloque codificante (bloque2) se pudieron posicionar las mutaciones RHC. En el entorno del haplotipo AA se encontraron las variantes R151C y D294H. El segundo haplotipo más frecuente en nuestra población, TA portó la mutación R160W. Esta última mutación se encontró en alto desequilibrio de ligamiento con el SNP rs3212369 (D=0.995), el cual se halla en la región codificante del gen. Además la mutación R151C mostró un p muy significativo para el DL desequilibrio de ligamiento con el SNP rs8045560 (D=0.995) (Tabla 9).

Tabla 8. Frecuencia y asociación de haplotipos del gen MC1-R con el riesgo al MM.

| R151C | D294H | R160W | rs8045560 | rs2270459 | rs3212346 | rs3212363 | rs3212369 | Frecuencia de casos | Frecuencia de controles | OR (95% CI) | p-valor |
|-------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|-------------------------|---------------------------|--------------|
| C | G | C | T | G | G | A | A | 0.311 | 0.289 | 1.00 | --- |
| C | G | C | C | G | G | T | A | 0.259 | 0.304 | 0.48 (0.19- 1.2) | 0.12 |
| C | G | C | C | G | G | A | G | 0.204 | 0.118 | 1.03 (0.36- 2.94) | 0.96 |
| C | G | C | C | G | G | A | A | 0.039 | 0.180 | 0.21 (0.057- 0.81) | 0.026 |
| C | G | C | C | G | A | T | A | 0.047 | 0.024 | 2.08 (0.20 - 20) | 0.54 |
| C | G | T | C | G | G | T | A | 0.051 | NA | | |

Tabla 9. Análisis del Desequilibrio de ligamiento (DL) en los haplotipos del gen MC1-R

| Mutaciones RHC | rs8045560 | rs2270459 | rs3212346 | rs3212363 | rs3212369 |
|-----------------------|--|--------------------------|--------------------------|--|--------------------------|
| D294H | D=0.368 p-valor=0.331 | D=0.912 p-valor=0.717 | D=0.114 0.396 | D=0.99 p-valor=0.156 | D=0.694 p-valor=0.519 |
| R151C | D=0.995 p-valor=0.019 | D=0.922 p-valor=0.743 | D=0.209 p-valor=0.164 | D=0.001 p-valor=0.204 | D=0.984 p-valor=0.414 |
| R160W | D=0.991 p-valor=0.109 | D=0.912 p-valor=0.717 | D=0.956 p-valor=0.548 | D=0.995 p-valor=0.002 | D=0.982 p-valor=0.361 |

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE MC1-R

En suma, se hallaron mutaciones ya descritas para el gen MC1-R en la población uruguaya. Por un lado se encontraron mutaciones de alta penetrancia que dan lugar al fenotipo RHC tales como la mutación R151C, R160W y D294H, y por otro lado se encontraron también mutaciones de baja penetrancia tales como la mutación V60L, R163Q y I155T (tabla 6). Además a partir de la secuenciación del gen MC1-R se detectaron dos mutaciones novedosas adyacentes, una de ellas es una mutación no sinónima, P268S y en la posición contigua se halló otra mutación sinónima (C267C) en el mismo individuo (ver figura 13). La mutación no sinónima se encuentra en el dominio extracelular de la proteína y está en una posición del gen muy conservada evolutivamente, por lo que un cambio de aminoácido en dicha posición afectará significativamente a la función de la proteína. Mediante el programa www.SNPs3d.org se detectó que el cambio P268S será deletéreo para la proteína, debido a que el parámetro que mide cuan dañino será el cambio en la estructura proteica dio un valor negativo (valor $Z = -1.27$). Dicho valor se calcula en base a la entropía de cada posición nucleotídica y en base a la homología de secuencias. Cuanto más negativo dicho valor más dañina será la mutación.

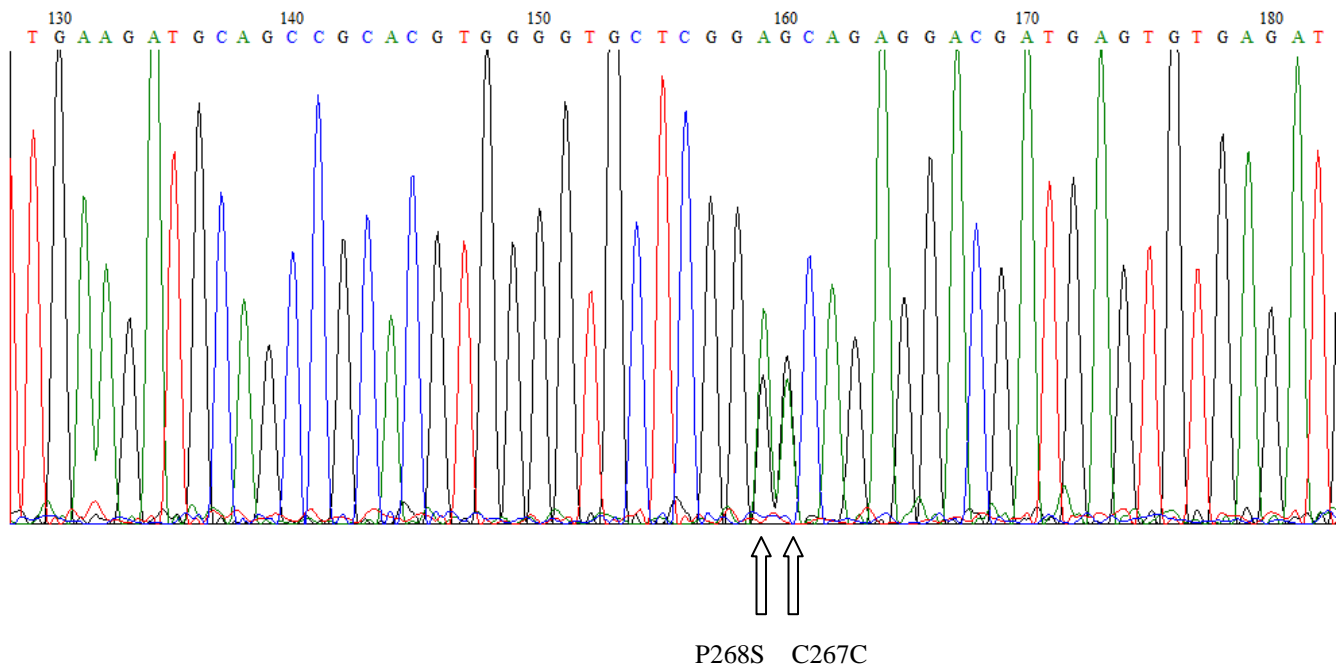


Figura 13. Electroferograma de un individuo control portador de dos mutaciones novedosas: P268S y C267C

Tabla 10. Modelo logístico corregido por mestizaje para estudiar la asociación entre PV92 y ciertas características fenotípicas

| Variables fenotípicas y genéticas | OR | D.E | p-valor |
|--|-----------|------------|----------------|
| pv92 (sin inserto) | 3.448 | 0.5821 | 0.0370 |
| Fototipo (I/II) | 3.922 | 0.5255 | 0.0095 |
| Nevos atípicos | 9.163 | 0.6482 | 0.0006 |
| Nevos congénitos | 5.925 | 0.7307 | 0.0149 |
| Exposición vacacional a los 15 años | 1.755 | 0.2446 | 0.0215 |

Se construyó un modelo de regresión logística en el cual se muestra la asociación de cada variable fenotípica, ambiental y también genética (donde se muestra la asociación genética de PV92) con el riesgo a desarrollar melanoma esporádico en la población uruguaya (Tabla 10). Para llevar a cabo dicha regresión logística se fue quitando aquellas variables que no mostraran asociación con el melanoma de manera de quedarse únicamente con las que sí contribuyeran a la enfermedad. De estos resultados se observa que la no inserción de PV92, el fototipo bajo (I y II), la presencia de nevos atípicos, la presencia de nevos congénitos y la exposición solar antes de los 15 años son evidentemente factores de riesgo muy importantes para el desarrollo de la enfermedad ya que mostraron valores de p significativos.

DISCUSIÓN

Este estudio fue pionero en Uruguay en cuanto al estudio de las características fenotípicas, epidemiológicas y genéticas del melanoma maligno esporádico cutáneo. Aún cuando en Latinoamérica este tipo de cáncer representa únicamente el 1.5% de todos los cánceres el Uruguay ocupa uno de los primeros puestos con mayores tasa de incidencia de MM junto con Argentina, Brasil y en menor medida Chile y Colombia (Globocan 2008). Por esta razón no deja de ser importante comprender la etiología de esta enfermedad.

FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DEL MM

Dentro de los principales factores de riesgo ambientales para el melanoma maligno se considera la exposición a la radiación ultravioleta. La exposición intermitente y continua aumenta el riesgo de desarrollar MM. En el presente estudio se separó la exposición al sol en forma recreacional, que implica una exposición acotada a un período del año, de la exposición continua. Claramente se observa que el riesgo aumenta en aquellas personas que se exponen intermitentemente. Pero, por otra parte, la exposición constante a largo plazo no tiene efecto sobre el mismo, e incluso se ha descrito que puede disminuir el riesgo a padecer melanoma maligno (CARLI *et al.* 1995; ELWOOD *et al.* 1985; MACKIE and AITCHISON 1982). En Europa el riesgo de desarrollar un MM es en promedio 1.61 para la exposición solar intermitente y de 2.03 para las quemaduras solares. Sin embargo la exposición solar ocupacional (o sea la exposición continua al sol) parece demostrar un efecto protector (RR=0.95) (GANDINI *et al.* 2005a). En la población de Australia se vio también que la exposición solar en la niñez y en la adultez junto con antecedentes de cáncer no melanoma y múltiples quemaduras solares se asocian a una alta susceptibilidad de desarrollar melanoma (WHITEMAN *et al.* 2001). Los datos observados para poblaciones como Europa y Australia, coinciden con nuestras observaciones donde la exposición solar y las quemaduras solares antes de los 15 años elevan el riesgo a desarrollar MM (ELWOOD and JOPSON 1997; GANDINI *et al.* 2005a; WHITEMAN *et al.* 2001) Nuestros resultados fueron muy similares a los obtenidos en poblaciones del centro-este de Argentina y del sur

de Brasil (BAKOS *et al.* 2002; LORIA and MATOS 2001; RUIZ LASCANO *et al.* 2004) lo cual es coherente debido a las estructuras poblacionales similares entre las tres (CORACH *et al.* 2010; LINS *et al.* 2010; SANTOS *et al.* 2010). De esta forma, estas dos variables constituyen los factores de riesgo más importantes para el MM. De hecho en muchos estudios epidemiológicos se ha demostrado que la exposición solar en la infancia es la mayor causa ambiental del melanoma esporádico y se ha visto que hasta un 65% de todos los casos de melanoma están relacionados a quemaduras solares (ARMSTRONG and KRICKER 1993; WHITEMAN *et al.* 2001).

Otro factor de riesgo importante en el desarrollo del MM es la presencia de nevos atípicos, los cuales son muy similares clínicamente al melanoma, se ha visto que estos son los marcadores más importantes para el riesgo a dicha enfermedad a través de todos los continentes, tanto en familias de alto riesgo como en poblaciones generales (BERWICK 1997; TUCKER *et al.* 1997). En nuestro estudio la presencia de los nevos atípicos se vio que aumenta significativamente el riesgo a padecer un MM (OR= 10.11) al igual que sucede en poblaciones argentinas (OR=6.3) (LORIA and MATOS 2001) y en poblaciones australianas e inglesas (OR=4.6 y OR=51.7 respectivamente) (BATAILLE *et al.* 1998).

Por otra parte el fototipo I y II, los cuales se refieren a un color de piel clara, ojos claros, pelo pelirrojo o rubio y la alta capacidad para quemarse al sol, también mostraron asociación significativa con el riesgo al melanoma en nuestro estudio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la población del sur de Brasil donde han demostrado que el fototipo I y II, la presencia de pecas, los nevos adquiridos y los atípicos son todos factores de riesgo con una fuerza moderada para el melanoma maligno cutáneo (BAKOS *et al.* 2002). Por otra parte en poblaciones del centro-este de Argentina se observó que el color de pelo claro (rubio o pelirrojo) es un factor de riesgo en comparación al color de pelo oscuro. También se describe al color de piel clara como factor de riesgo muy significativo en el desarrollo del MM (RUIZ LASCANO *et al.* 2004). Sin embargo en el sur de Brasil el color de ojos y de pelo mostró una débil asociación con el riesgo al melanoma con OR cercanos a 1 (BAKOS *et al.* 2002).

El fototipo bajo (I y II) como ya se ha mencionado constituye un factor de riesgo para el melanoma maligno ya que el mismo se define como una escala internacionalmente aceptada que está determinada fundamentalmente por la tolerancia a la irradiación solar moderada y la capacidad de bronceado. Además está determinada por el color de ojos, color de pelo y la tez de la persona. Actualmente se conocen cuales son los genes mayormente implicados en la pigmentación y su asociación con el riesgo a conferir MM, ya que una pigmentación clara es un factor de riesgo para el riesgo al melanoma maligno (HAN *et al.* 2006).

Aunque se han identificado muchos SNPs en diferentes genes de pigmentación, muy pocos se ha visto que se relacionen con el riesgo al cáncer de piel. Se sabe que los genes vinculados a la pigmentación humana presentan una abundante cantidad de variantes y están implicados en la formación, transporte y distribución de melanosomas y fueron identificados mediante modelos animales (NAN *et al.* 2009). De todos los genes implicados en la pigmentación se ha visto que el gen TYRP1 (rs 1408799), el cual codifica la proteína relacionada a la tirosinasa, TYRP1, y el gen TYR(R402Q), que codifica la tirosinasa, encargada de la melanización en los melanosomas, muestran una asociación significativa consistente con el riesgo a MM (DUFFY *et al.* 2010; FERNANDEZ *et al.* 2007; FERNANDEZ *et al.* 2008; GUDBJARTSSON *et al.* 2008). Esta variante de tirosinasa (R402Q) presenta únicamente el 25% de actividad catalítica de la forma R402, y esto causa albinismo ocular cuando co-ocurre con mutaciones en el gen OCA con mayor penetrancia en heterocigotos compuestos (HUTTON and SPRITZ 2008). Por otro lado el SNP rs16891982 (F374L) del gen SLC45A2 mostró un efecto protector del MM en casos españoles (OR=0.41), lo cual consistía con un color de piel oscura, ojos oscuros, pelo oscuro y presencia de lunares (FERNANDEZ *et al.* 2008). Sin embargo este mismo SNP(rs 16891982) sí mostro una gran asociación con el riesgo al MM en poblaciones de Australia (DUFFY *et al.* 2010). Además se vio que un SNP, R419Q (rs 1800407), en la región no codificante del gen OCA-2 también mostraba una asociación leve con el riesgo al MM (FERNANDEZ *et al.* 2009) en análisis multivariados ajustados por otros loci de pigmentación.

En nuestro estudio se analizó uno de los genes implicados en la pigmentación humana, el gen SLC24A5, el cual codifica una proteína intercambiadora de sodio/calcio dependiente

de potasio, y está implicado en la melanogénesis. El gen SLC24A5 humano se requiere para la maduración del melanosoma y tiene un rol en la pigmentación de la piel (LAMASON *et al.* 2005; SCHNETKAMP 2004).

Dicho gen SLC24A5 se ha visto en estudios previos que no muestra asociación con el melanoma, sin embargo se sabe que es un gen que está relacionado con la síntesis de la melanina y por ende con la pigmentación humana. El mismo presenta en el tercer exón el polimorfismo rs1426654, que genera una mutación no sinónima debido a un cambio de alelo G a A, lo cual da lugar a un cambio de alanina a treonina. Los dos alelos varían en frecuencia según las distintas poblaciones. El alelo A se encuentra en 98-100% en poblaciones europeas-americanas, mientras el alelo G se halla más frecuentemente en poblaciones de África, indígenas- americanas y del Este de Asia. Esta diferencia de frecuencias alélicas entre las poblaciones lo hace ser un adecuado marcador de ancestralidad. En nuestro estudio se analizó el SNP rs1426654 y no se detectó diferencias en las frecuencias alélicas entre los casos y los controles. Esto quiere decir que dicho SNP midió la pigmentación de la piel en la muestra de casos y de controles de la misma manera. El mismo no mostró asociación con el riesgo al MM. En nuestro laboratorio sí detectamos asociación para una de las variantes del gen MC1-R y el riesgo al MM, el cual es el gen candidato del melanoma esporádico. Dicho gen también está implicado en la pigmentación de la piel y hablaremos de él más adelante.

Finalmente se estudió la ascendencia de los abuelos de los integrantes del estudio para ver el origen de esta enfermedad. Se vio que existe un exceso de ancestralidad europea en los pacientes afectados por MM en relación a los individuos sanos. Esto significa que la ascendencia europea constituyó un factor de riesgo para el desarrollo del MM en Uruguay lo cual era de esperar ya que las personas que provienen de Europa mayoritariamente del Norte son de piel clara (CARLI *et al.* 1995). Nuestros resultados fueron similares a un estudio realizado en Argentina donde vieron que la ascendencia europea actúa como factor de riesgo para las personas que tienen abuelos nacidos en Europa en comparación con personas que tienen abuelos nacidos en Sudamérica (RUIZ LASCANO *et al.* 2004).

Mediante la metodología de aproximación al Mapeo por Mestizaje, hemos encontrado una región candidata en el cromosoma 16 (16q) para el desarrollo del MM. Para determinar exactamente la composición genética de la población uruguaya se utilizó el programa Structure que nos permitió conocer las contribuciones de las 3 poblaciones parentales en nuestra población (ver tabla 5). Para ello se utilizaron los 56 marcadores de ancestralidad en el análisis para el cual contamos con las frecuencias alélicas de las poblaciones parentales. Según este programa vimos que el aporte europeo fue el mayoritario tanto en casos como en controles (92.4% en los casos y un 87.6% en los controles), luego le siguió el amerindio (un 4.7% y 7.5% de en los casos y controles respectivamente). Por último se vio que el aporte africano fue el minoritario en nuestra población (2.9% vs.4.9% en casos y controles respectivamente). Estos datos son muy similares a los previamente descritos por Hidalgo y col (2005), el cual obtuvo los siguientes resultados: un 84.1% de genes europeos, seguido de un componente amerindio 10.4% y un componente africano minoritario de 5.36%. A su vez nuestros resultados también fueron comparables con los reportados para Montevideo a excepción de que el aporte amerindio es el minoritario en esta ciudad en vez del africano como en el resto del país (92% europeos, 7% de africanos y 1 % de amerindios). Estos datos fueron basados en el sistema de grupos sanguíneos, proteínas del suero y enzimas del eritrocito (SANS *et al.* 1997).

La población uruguaya presenta un nivel moderado de mestizaje con un predominante componente europeo y un modesto aporte amerindio y africano. Esto apoya la idea de que la población uruguaya presenta una estructura trihíbrida (SANS *et al.* 1997) llevada a cabo por una migración europea que ocurrió principalmente en el siglo pasado (ODDONE 1966), y por una base indígena y un aporte africano que ocurrió durante los siglos XVII al XIX.

De 5 marcadores que mostraron asociación con el melanoma sin la corrección de ancestralidad individual, únicamente dos de ellos presentan genes en su cercanía que pueden estar involucrados en procesos oncogénicos. Esta corrección de ancestralidad se debe realizar ya que al utilizar marcadores de ancestralidad para detectar asociaciones de la

enfermedad con ciertas regiones cromosómicas se necesita eliminar el efecto de la ancestralidad de cada individuo. Uno de ellos es el rs 2065160 (TSC111025) y el otro es rs3138523 (PV92). El primero, se localiza en la región cromosómica 1q32.1 y se sabe que está muy cerca de una región asociada al síndrome de Chediak-Higashi (1q42.3) (BONILLA *et al.* 2004c). Dicho síndrome, el cual es una enfermedad hereditaria de los sistemas inmunitario y nervioso, que se transmite a la descendencia de forma autosómica recesiva, se caracteriza por una deficiencia en la pigmentación de la piel, por lo que en individuos portadores de dicha enfermedad se observa una coloración pálida del cabello, los ojos y la piel. Se sabe que mutaciones en el gen regulador del tráfico lisosomal es lo que causa dicho síndrome. También se vio que el marcador TSC111025 está muy cerca de otros genes que están implicados en procesos oncogénicos, tales como el gen LRRN2, el cual está a 1Kb de dicho marcador. Este gen codifica una proteína rica en repeticiones ricas en leucina y se ha visto que dicho gen esta sobreexpresado en gliomas malignos (ALMEIDA *et al.* 1998). Por otra parte también está en la cercanía de dicho marcador el gen PI3KC2B, el cual codifica una quinasa (fosfoinositol-3quinasa) que está implicada en vías de señalización celular que tienen que ver con la proliferación celular, transformación oncogénica, migración celular, etc. También está presente a 3Kb del marcador TSC111025 el gen MDM4, que codifica a una proteína de unión a la proteína p53. La proteína MDM4 une a p53 e inhibe su función de supresor de tumores (MANCINI *et al.* 2010). Esta se ha visto que está sobreexpresada en varios cánceres humanos, como el cáncer de mama (HONGBO and CHUNHONG 2011). El marcador PV92 del cual hablaremos más adelante, se halla en la región cromosómica 16q23.3 y se sabe que está muy cercano al gen MC1-R, candidato de melanoma esporádico.

Por otra parte, de los 12 marcadores que mostraron asociación con el riesgo a MM luego de corregir por el mestizaje individual, algunos de estos presentaron en su cercanía genes que de cierta manera también estaban vinculados al desarrollo del cáncer y por ende podrían estar relacionados con el desarrollo de MM. En la región 16q12.1 que involucra al marcador rs 1004704 se encuentra el gen denominado ABCC12 o MRP9, un transportador de unión a ATP que aumenta su expresión en cáncer de mama. El mismo codifica para una proteína de unión al ATP y la misma contiene 2 dominios de unión al ATP y 12 regiones transmembranas. El SNP rs 10486576 se encuentra muy cercanamente al gen que codifica

una proteína nuclear con dedos de cinc (7p15.2) que funciona como represor transcripcional y se ha visto que está implicado en el desarrollo del cáncer de próstata (LIU *et al.* 2011). Además el rs 10520678 también tiene genes cercanos como el NTRK3 (15q25) que codifica un receptor de membrana el cual es una tirosínquinasa neurotrópica que puede actuar como oncogén promoviendo la tumorigénesis, por lo que mutaciones en dicho gen se asocian a meduloblastomas y a otros tipos de cánceres (WOOD *et al.* 2006). Otro SNP que presenta en su cercanía genes relacionados al cáncer es el rs842634 el cual tiene un oncogen viral (REL-V) que está a 100 Kb del SNP (2p16.1) y codifica para un factor transcripcional que es un miembro de la familia Rel. Estas proteínas se relacionan por un dominio N-terminal (dominio Rel) responsable de la unión al ADN, dimerización y localización nuclear (BELGUISE and SONENSHEIN 2007). Además cercano a él se encuentran el gen que codifica una polimerasa PAPol6, y un gen llamado BCL11 asociado a leucemia. El rs 9302185 también se detectó que tiene adyacente al oncogen RAS (15q15) y otro gen denominado MYO5A que codifica la miosina y se vio que es muy abundante en los melanocitos. Otro SNP que tiene en su cercanía genes implicados indirectamente con el cáncer es el rs2208139 que está cerca del gen DHx35 que codifica para una ARN helicasa (20q11) que presentan motivos característicos Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD); estas están implicadas en procesos celulares que se relacionan con la alteración de la estructura secundaria del ARN, como el inicio de la traducción, el “splicing” nuclear y mitocondrial. En todos estos SNPs estudiados se vio que presentaron genes adyacentes que de cierta manera se asocian con el desarrollo del algún cáncer, por lo que de cierta forma podrían estar contribuyendo, junto con otros genes, al desarrollo del melanoma esporádico.

Finalmente el marcador PV92 que mostró una gran asociación significativa entre casos y controles ($p=0.002$), se encuentra en la región cromosómica 16q23.3 dentro del intrón correspondiente al gen CDH13, el cual codifica una proteína denominada caderina del corazón. Además se encuentra relativamente cerca (7Mb) del principal gen que confiere susceptibilidad al MM denominado MC1-R, sobre el cual nos explayaremos en la siguiente sección. La caderina del corazón, producto de este gen, está localizada en la superficie de la membrana celular pero no está anclada al dominio transmembrana. La misma actúa como protector contra la apoptosis por estrés oxidativo en las células vasculares endoteliales y además actúa como regulador del crecimiento axonal durante la diferenciación neural. El

gen CDH13 se encuentra hipermetilado en ciertos cánceres tales como cáncer de mama y cáncer de esófago (RIENER *et al.* 2008). Si bien este gen CDH13 no se ha visto en la literatura que esté directamente implicado en el desarrollo del melanoma, sí se ha visto que está relacionado al cáncer gástrico debido a que este gen es un supresor de tumor que está en una región de una muy alta pérdida de heterocigosidad (MORI 1999). Debido a la importante asociación que mostró PV92 con el riesgo al MM y debido a que en la región 16q también está presente el principal gen candidato del MM esporádico, MC1-R, es que se considera a esta región de susceptibilidad para el MM.

VARIANTES DEL MC1-R

En nuestra población detectamos una diferencia significativa entre una de las variantes del gen MC1-R (R160W) y el riesgo a padecer MM en la población uruguaya. Estos datos concuerdan con lo observado para poblaciones españolas, donde además se observa asociación de la variante D294H con el riesgo al MM (FERNANDEZ *et al.* 2007). Los individuos portadores de la mutación R160W, los cuales eran pacientes, tenían un fototipo bajo (I/II). A dicha mutación se la encontró en una frecuencia de 5% en la población uruguaya, lo cual se asemeja a la encontrada en España (FERNANDEZ *et al.* 2007) (3% en los casos españoles) y a otras poblaciones del Mediterráneo. Esta similitud en la frecuencia de la mutación es de esperar ya que nuestra población proviene en su mayoría de poblaciones europeas. En estudios previos se vio que esta variante funcionalmente mostraba una habilidad disminuída para estimular la producción de AMPc en respuesta a la melanocortina. Además una reducción en la expresión de la superficie celular de la misma sugiere un dañado procesamiento de la proteína MC1-R (GARCIA-BORRON *et al.* 2005). En estudios recientes se demostró que aquellos individuos portadores de la mutación R160W presentan también una asociación significativa con los nevos melanocíticos (AVILES *et al.* 2011). Los nevos melanocíticos aumentan el riesgo a tener melanoma de un 2-4% dependiendo de la población de estudio (CHANG *et al.* 2009). Por lo que esto estaría indicando que dicha mutación no solo está implicada en determinar el color de pelo

pelirrojo sino también estaría asociada a la presencia de nevos melanocíticos los cuales como vimos previamente también constituyen un factor de riesgo para el MM.

Para el resto de las variantes RHC (R151C y D294H) del gen no se mostró ninguna asociación significativa con la enfermedad en la población uruguaya, por lo que significaría que estas variantes no estarían implicadas directamente en la etiología del MM. La mutación R151C se encontró en frecuencias de 3% y 1% para casos y controles respectivamente en nuestra población y la D294H se encontró en 1% en casos y 2% en controles. Dichas frecuencias fueron similares en frecuencias a la población española, (FERNANDEZ *et al.* 2007), al igual que otras poblaciones del Mediterráneo y en contraste con poblaciones del Norte de Europa (VALVERDE *et al.* 1995). Con respecto a las otras variantes del MC1-R, las no-RHC (I155T y R163Q) se detectaron en muy baja frecuencia en la población uruguaya ya que la muestra de individuos analizados fue pequeña para estas mutaciones. Al comparar nuestros resultados con un estudio realizado en Uruguay acerca de melanoma de tipo hereditario (LARRE BORGES *et al.* 2009) se encontraron las mismas variantes del gen MC1-R con frecuencias similares a excepción de la mutación R160W que no se la detectó en dicho estudio. Todas las variantes encontradas en nuestra población se encuentran en las poblaciones caucásicas de países europeos (GERSTENBLITH *et al.* 2007) con excepción de dos mutaciones novedosas que únicamente fueron detectadas en la población uruguaya (P268S y C267C). Ambas fueron halladas en un individuo control de avanzada edad. Ambas mutaciones caen en el dominio extracelular de la proteína MC1-R (SANCHEZ-LAORDEN *et al.* 2007). La mutación no sinónima P268S presentó un índice alto de conservación aminoacídica para esa región, obtenido mediante el programa SNPs3D Home, lo que indica un posible cambio de función de la proteína MC1-R. Sin embargo en el caso de la otra mutación al ser un cambio sinónimo no tendrá efecto alguno sobre la función de dicha proteína. Este individuo de 80 años de ascendencia europea, con una pigmentación clara, quemaduras solares y una exposición solar intermitente durante su niñez no presentó la enfermedad, esto sugeriría que dicha mutación por sí misma no confirió susceptibilidad al MM en ese individuo, pero probablemente sí podría estar implicado en conferir una pigmentación de piel clara, y en el fototipo bajo de dicho individuo. Si bien las dos mutaciones se encontraron en el mismo individuo, no pudimos determinar si ambas están en el mismo cromosoma o en cromosomas homólogos, por lo

que a modo de perspectiva de nuestro trabajo se clonará dicho gen en un plásmido y luego se lo volverá a secuenciar con el fin de determinar la fase de estas mutaciones. Además la mutación P268S se debería estudiarla en otros individuos con el fin de determinar cuál es su efecto sobre el fenotipo cutáneo y en los hijos de dicho paciente, con el fin de detectar el modo de herencia de dicha mutación.

Con el objetivo de estudiar qué otras variantes del gen MC1-R pueden estar directamente implicadas en causar la enfermedad, se realizaron estudios de haplotipos a lo largo de la región promotora y 5' y 3' UTR del gen. A partir de dicho análisis se detectaron 7 haplotipos para el bloque 1 en la población uruguaya. Los haplotipos se obtuvieron en frecuencias distintas y similares a las poblaciones europeas, asiáticas, y africanas del Hapmap, y a la población española (IBARROLA-VILLAVA *et al.* 2010). Asimismo, el haplotipo que se encontró en una frecuencia mayor en nuestra población fue el CGG al igual que en las poblaciones asiáticas y africanas tomadas del Hapmap. Mientras que el haplotipo TGG fue el segundo en frecuencia a diferencia de las poblaciones europeas y españolas en las cuales este es el mayoritario. Por otra parte encontramos un haplotipo que presenta la población uruguaya y la africana. Además hemos encontrado tres haplotipos que son característicos de nuestra población, CGA, TGA y CTG. Por lo tanto estos haplotipos serían característicos de la población uruguaya. Además la diferencia en las frecuencias para los haplotipos CGG y TGG con relación a la población europea del HapMap y la similitud en frecuencia de otros haplotipos que integran el bloque 2 (conteniendo la región 5' y 3' UTR) confirman que la población uruguaya proviene en una mayor parte de la población europea. Sin embargo existen otras contribuciones parentales más pequeñas que se reflejan en estos resultados ya que el haplotipo CGA únicamente es característico de los africanos (20.9%) y de nuestra población (1.7% y 1.6% en casos y controles respectivamente). De esta manera se verifica la estructura de la población uruguaya, la cual presenta una estructura trihíbrida, que está formada por tres componentes: europeo como componente mayoritario, africano y amerindio (SANS *et al.* 1997; SANS 1991b). Estos resultados son también evidenciados mediante nuestro estudio de mestizaje en la población uruguaya, donde se muestra el diagrama de puntos en el cual se ve que la muestra de casos y de controles están inmersas en la población europea, aunque también aparecen pero en menor proporción el aporte de la

población amerindia y la africana (figura 8). La generación de estos nuevos haplotipos encontrados en la población uruguaya se puede deber a diversos mecanismos genéticos. En primer lugar puede deberse a eventos de recombinación de los haplotipos que provinieron de Europa y esto originaría haplotipos distintos en ambas poblaciones.

Otra hipótesis puede ser que los individuos europeos portadores de estos haplotipos hayan tenido un efecto fundador en nuestra población, y luego una expansión demográfica de los mismos que hizo que confirieran más susceptibilidad al MM. Finalmente la diferente estructura haplotípica de nuestra población también puede explicarse por la mezcla existente en la población uruguaya debido a las migraciones que ocurrieron de africanos, europeos y amerindios a nuestro país.

A pesar del surgimiento de nuevos haplotipos de 5 SNPs del MC1-R, en nuestra población, no se detectó asociación estadística para ninguno de los mismos con el riesgo a desarrollar melanoma esporádico. Sin embargo, cuando además analizamos las tres mutaciones RHC en la región codificante del gen MC1-R, se observó un haplotipo protector de la enfermedad ya que se obtienen los haplobloques 1 y 2 más frecuentes en la población uruguaya (CGG y AA) y además una combinación de los alelos normales de las mutaciones. Las mutaciones RHC se hallaron en frecuencias similares a las obtenidas en poblaciones de España (FERNANDEZ *et al.* 2007; SCHERER *et al.* 2009), por lo que esto indica que la región codificante del gen MC1-R es claramente europea.

Nuestros datos concuerdan con los obtenidos para poblaciones de España donde estudiaron estas mutaciones RHC y estos 5 tag-SNPs. En el trabajo de Ibarrola y col (2010) observan que en el entorno del haplotipo AA de la región codificante del gen aparecen las variantes R151C y D294H, sin embargo la variante R160W aparecen en el entorno del haplotipo TA. Estas combinaciones fueron idénticas a las observadas en Uruguay.

Como se ha mencionado anteriormente la región 16 q parece ser una región cromosómica que confiere susceptibilidad al MM debido a que en su cercanía está el gen MC1-R, el cual ya vimos que se asocia al riesgo al MM y además existen otros genes tales como FXBO31, y TUBB3, y CDH1 los cuales están implicados indirectamente en procesos oncogénicos. Se han reportado estudios de la región 16q22-q24 en los que se observa una pérdida de heterocigosidad en dicha región en muchos tipos de tumores como de hígado, de mama, ovario, y de pulmón (DORION-BONNET *et al.* 1995; JOHNS *et al.* 1996; NISHIDA *et al.* 1992;

SATO *et al.* 1990). En ciertos cánceres la pérdida alélica en esas bandas cromosómicas puede conllevar al desarrollo de un cáncer ya que muchas veces se pierde la función de los genes supresores de tumores.

El gen FXBO31 es un gen supresor de tumores y está implicado en la respuesta al daño del ADN (DDR) debido a la irradiación gama. Esta respuesta de las células al daño del ADN implica la captura en el ciclo celular con la reparación del ADN. Este factor actúa mediante una vía directa de proteosoma que media la degradación de la ciclina D1, el cual es un importante regulador del pasaje de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. La degradación de la misma resulta de la interacción directa de FXBO31 para lo cual este presenta un motivo F-box y de la fosforilación de la ciclina D1 en la treonina 286, la cual es requerida para la proteólisis de la ciclina D1. Por otro lado el gen TUBB3 que está implicado en la formación del huso mitótico de células neuronales y no neuronales, también se vio que su expresión es específica de los axones de tejidos benignos, piel normal y neurofibromas cutáneos. Además se ha encontrado asociación entre la expresión de la tubulina III con el alto grado histológicamente de malignidad en tumores no neuronales (KATSETOS *et al.* 2003). Su expresión se asocia a enfermedades como la neurofibromatosis 1 (NF1), el cáncer de mama y a otros tumores epiteliales malignos (JOUHILAHTI *et al.* 2008). El gen TUBB3 se encuentra a 2500 pb del MC1R. El gen tiene un muy complejo e ineficiente sitio poliA, el cual es muy importante para permitir el splicing intergénico entre este locus y el de su gen cercano corriente abajo TUBB3. Estos transcritos producen dos isoformas distintas de proteínas que se localizan en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático. Los mismos se han visto que se restringen a humanos ya que no se ha encontrado ARNm quiméricos en melanocitos de ratón. Además se propone que estas proteínas quiméricas sirven para equipar a los melanocitos con fenotipos celulares novedosos requeridos como parte de la respuesta a la pigmentación (DALZIEL *et al.* 2010). Recientemente en nuestro laboratorio, se analizaron SNPs en estos genes FXBO31 (rs 11649550, rs 4843599, rs 9937099) y TUBB3 (rs 7191944) pero no encontramos asociación con el riesgo al MM para ninguno de ellos, por lo que se seguirá estudiando una mayor cantidad de variantes en estos genes y en otros que estén en la región candidata 16q.

Para la población uruguaya se vio mediante un modelo de regresión logística, que una persona será más susceptible a padecer el melanoma si no presenta el inserto Alu correspondiente a PV92, si tiene nevos displásicos o atípicos, que además presenta nevos congénitos y que presenta un fototipo I o II, el cual se asocia a una piel clara ojos claros y pelo claro, y finalmente una persona que también se haya expuesto al sol durante su adolescencia de una manera intermitente. Una persona con todos estos factores de riesgo genéticos, fenotípicos y ambientales probablemente presente un riesgo mucho mayor a desarrollar melanoma esporádico que otra persona que no esté expuesta a estos factores. Dicho estudio del melanoma en la población uruguaya mostró resultados similares a los obtenidos en otras poblaciones latinoamericanas como Argentina y Brasil, que también muestran asociación para dichas variables con el riesgo al MM.

La etiología del MM esporádico aún permanece incierta, sin embargo en este trabajo se ha demostrado que existe una región cromosómica (16q) que confiere susceptibilidad a esta enfermedad y que la misma contienen al gen candidato del MM, MC1-R, que se ha visto que también confiere riesgo al MM, y probablemente contenga otros genes que también contribuyan al desarrollo de la misma. Por otra parte, los factores fenotípicos y ambientales se ha visto que contribuyen significativamente al riesgo al MM, al igual que en otros estudios previamente reportados, entre ellos se encuentra la exposición solar en exceso durante la niñez, las quemaduras solares, el fototipo y la presencia de nevos atípicos.

CONCLUSIONES:

Dentro de los factores de riesgo del MM fenotípicos y ambientales, vimos que el fototipo I/II, los nevos melanocíticos, la exposición solar vacacional en la niñez, la presencia de nevos atípicos, nevos congénitos y nevos adquiridos, las quemaduras solares durante la niñez y adolescencia fueron factores muy importantes en conferir riesgo al MM en un individuo. Además se vio que aquellos individuos que no tienen el inserto Alu PV92 también fueron más susceptibles al desarrollo de un MM.

La ascendencia europea también constituyó un factor de riesgo para el desarrollo del melanoma esporádico ya que se vio que en la muestra de pacientes afectados MM existió un exceso de ancestralidad europea en comparación con los individuos control. Esta característica a su vez hace a la población uruguaya un blanco adecuado para aplicar el método de mapeo por mestizaje, ya que un exceso de ancestralidad en una determinada región cromosómica se puede comparar entre casos y controles y de esta forma buscar genes que confieran susceptibilidad al MM.

Mediante el análisis de los MIAs, se estimó los aportes de las 3 poblaciones parentales con un mayor aporte europeo seguido de un aporte amerindio significativo y un menor aporte africano. Además se detectó una asociación significativa entre el marcador PV92, el cual está muy cerca del gen candidato MC1-R, y el riesgo al MM. Mediante esta aproximación al mapeo por mestizaje logramos identificar una región cromosómica candidata (16q) que es capaz de conferir susceptibilidad al MM junto a factores de riesgo ambientales y fenotípicos en la población uruguaya.

En cuanto al gen MC1-R encontramos haplotipos nuevos en la región promotora del gen MC1-R en la población uruguaya, y además detectamos haplotipos que difieren en la frecuencia con respecto a la población española y europea. La estructura haplotípica del gen MC1-R mostró características propias de la población uruguaya y esto en parte se explica por procesos genéticos-evolutivos de expansión demográfica de poblaciones parentales europeas. Además posibles eventos de recombinación, o procesos propios de la estructura

mestizada del Uruguay también pueden explicar la generación de nuevos haplotipos identificados en nuestra población.

Se encontraron dos mutaciones nuevas para el gen MC1-R descritas solamente en el Uruguay, una de ellas es un cambio sinónimo (C267C) y la otra es un cambio no sinónimo denominada P268S, en un control sano.

Finalmente encontramos que el gen MC1-R está implicado en conferir riesgo al MM en la población uruguaya, aunque deben existir otros genes que actúen sinérgicamente con éste para desarrollar el MM ya que se trata de una enfermedad compleja.

PERSPECTIVAS

Como perspectiva más importante de este trabajo está continuar con la secuenciación del gen MC1-R para un mayor número de muestras, con el fin de encontrar mutaciones nuevas en nuestra población y además analizar las mutaciones ya descritas. Otra perspectiva de este trabajo es aumentar el número de muestras y el número de SNPs para los genes que estén localizados en la región 16q (entre ellos TUBB3, FXBO31) con el fin de mapear más fino dentro de esta región. De esta manera contando con un mayor número de marcadores dentro de esta región cromosómica se podrá tener un mayor conocimiento acerca de la genética del melanoma esporádico.

BASES ELECTRÓNICAS

The m-fold web server: www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold

Peak Scanner™ software v1.0: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab>

Kaspar SNP Genotyping System KBiosciences: <http://www.kbioscience.co.uk/>

MacroGen Advancing Through Genomics: www.macrogen.com

Bioedit Sequence Alignment Editor: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

SNPs3D Home: www.SNPs3d.org

Epiinfo v3.5: <http://www.cdc.gov/epiinfo/>

Programa R: <http://cran.r-project.org/>

Ensembl Genome Browser: www.ensembl.org

Globocan 2008: <http://globocan.iarc.fr>

National Program of Cancer Registries (NPCR): <http://www.cdc.gov/cancer/npcr/>

Universitat de Lleida: <http://web.udl.es/>

BIBLIOGRAFÍA

- ABBASI, N. R., H. M. SHAW, D. S. RIGEL, R. J. FRIEDMAN, W. H. MCCARTHY *et al.*, 2004 Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* **292**: 2771-2776.
- ACTON, R. T., E. H. BARTON, W. W. HOLLOWELL, A. L. DREIBELBIS, R. C. GO *et al.*, 2004 Ancestry reported by white adults with cutaneous melanoma and control subjects in central Alabama. *BMC Cancer* **4**: 47.
- ALMEIDA, A., X. X. ZHU, N. VOGT, R. TYAGI, M. MULERS *et al.*, 1998 GAC1, a new member of the leucine-rich repeat superfamily on chromosome band 1q32.1, is amplified and overexpressed in malignant gliomas. *Oncogene* **16**: 2997-3002.
- ALTMULLER, J., L. J. PALMER, G. FISCHER, H. SCHERB and M. WJST, 2001 Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* **69**: 936-950.
- ANCANS, J., M. J. HOOGDUIJN and A. J. THODY, 2001 Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J Invest Dermatol* **117**: 158-159.
- AOKI, K., 2002 Sexual selection as a cause of human skin colour variation: Darwin's hypothesis revisited. *Ann Hum Biol* **29**: 589-608.
- ARGENZIANO, G., and H. P. SOYER, 2001 Dermoscopy of pigmented skin lesions--a valuable tool for early diagnosis of melanoma. *Lancet Oncol* **2**: 443-449.
- ARMSTRONG, B. K., and A. KRICKER, 1993 How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* **3**: 395-401.
- ATKINS, M. B., M. T. LOTZE, J. P. DUTCHER, R. I. FISHER, G. WEISS *et al.*, 1999 High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* **17**: 2105-2116.
- AUTIER, P., and J. F. DORE, 1998 Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Cancer* **77**: 533-537.
- AVILES, J. A., P. LAZARO, L. P. FERNANDEZ, J. BENITEZ, M. IBARROLA-VILLAVA *et al.*, 2011 Phenotypic and Histologic Characteristics of Cutaneous Melanoma in Patients With Melanocortin-1 Receptor Polymorphisms. *Actas Dermosifiliogr*.
- BAKOS, L., M. WAGNER, R. M. BAKOS, C. S. LEITE, C. L. SPERHACKE *et al.*, 2002 Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol* **41**: 557-562.
- BALLO, M. T., and K. K. ANG, 2004 Radiotherapy for cutaneous malignant melanoma: rationale and indications. *Oncology (Williston Park)* **18**: 99-107; discussion 107-110, 113-104.
- BARRETT, J. C., B. FRY, J. MALLER and M. J. DALY, 2005 Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**: 263-265.
- BARRIOS, E., 2010 *III Atlas de incidencia del cáncer en el Uruguay*. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer.
- BARSH, G. S., 1996 The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* **12**: 299-305.
- BARSH, G. S., 2003 What controls variation in human skin color? *PLoS Biol* **1**: E27.

- BARTH, A., L. A. WANEK and D. L. MORTON, 1995 Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* **181**: 193-201.
- BASTIAENS, M. T., J. A. TER HUURNE, C. KIELICH, N. A. GRUIS, R. G. WESTENDORP *et al.*, 2001 Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Genet* **68**: 884-894.
- BATAILLE, V., 2003 Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* **39**: 1341-1347.
- BATAILLE, V., A. GRULICH, P. SASIENI, A. SWERDLOW, J. NEWTON BISHOP *et al.*, 1998 The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. *Br J Cancer* **77**: 505-510.
- BEAUMONT, K. A., 2011 Melanocortin MC1 receptor in human genetics and model systems. *Eur J Pharmacol* **1**: 7.
- BELGUISE, K., and G. E. SONENSHEIN, 2007 PKC θ promotes c-Rel-driven mammary tumorigenesis in mice and humans by repressing estrogen receptor alpha synthesis. *J Clin Invest* **117**: 4009-4021.
- BENNETT, D. C., and M. L. LAMOREUX, 2003 The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* **16**: 333-344.
- BERROCAL, A., C. CAMPS, J. L. GONZÁLEZ, V. GUILLEN; and M. SALVADOR, 2010 *Tratado actualizado del melanoma*. Glosa, S.L, Barcelona.
- BERTONI, B., 2011 Admixture Mapping and Genetic Technologies: Perspectives from Latin America, pp. 103-121 in *Racial Identities, Genetic Ancestry, and Health in South America*, edited by RICARDO VENTURA SANTOS, SAHRA GIBBON, AND MÓNICA SANS. PALGRAVE MACMILLAN®, Nueva York.
- BERTONI, B., L. JIN, R. CHAKRABORTY and M. SANS, 2005 Directional mating and a rapid male population expansion in a hybrid Uruguayan population. *Am J Hum Biol* **17**: 801-808.
- BERWICK, M. H. A., 1997 Melanoma Epidemiology. *Curr Opin Oncol* **9**: 178-182.
- BEVONA, C., and A. J. SOBER, 2002 Melanoma incidence trends. *Dermatol Clin* **20**: 589-595, vii.
- BLISS, J. M., D. FORD, A. J. SWERDLOW, B. K. ARMSTRONG, M. CRISTOFOLINI *et al.*, 1995 Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* **62**: 367-376.
- BONILLA, C., B. BERTONI, S. GONZALEZ, H. CARDOSO, N. BRUM-ZORRILLA *et al.*, 2004a Substantial Native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *Am J Hum Biol* **16**: 289-297.
- BONILLA, C., L. A. BOXILL, S. A. DONALD, T. WILLIAMS, N. SYLVESTER *et al.*, 2005 The 8818G allele of the agouti signaling protein (ASIP) gene is ancestral and is associated with darker skin color in African Americans. *Hum Genet* **116**: 402-406.
- BONILLA, C., E. J. PARRA, C. L. PFAFF, S. DIOS, J. A. MARSHALL *et al.*, 2004b Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet* **68**: 139-153.
- BONILLA, C., M. D. SHRIVER, E. J. PARRA, A. JONES and J. R. FERNANDEZ, 2004c Ancestral proportions and their association with skin pigmentation and bone mineral density in Puerto Rican women from New York city. *Hum Genet* **115**: 57-68.

- BOX, N. F., J. R. WYETH, L. E. O'GORMAN, N. G. MARTIN and R. A. STURM, 1997 Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* **6**: 1891-1897.
- BRADFORD, P. T., 2009 Skin cancer in skin of color. *Dermatol Nurs* **21**: 170-177, 206; quiz 178.
- BRITO FORESTI, J., 1903 *Sarcomas melánicos de la piel*. Rev Med Urug, Montevideo.
- BULLIARD, J. L., B. COX and R. SEMENCIW, 1999 Trends by anatomic site in the incidence of cutaneous malignant melanoma in Canada, 1969-93. *Cancer Causes Control* **10**: 407-416.
- BURGUÉS- CALDERÓN, M. L. M., 2011 Factores de riesgo y detección temprana del melanoma maligno en pacientes con nevus melanocíticos. *Más Dermatol* **14**: 5-13.
- CAÑIGRAL, F. J., 1999 *Manual de prevención y tratamiento del melanoma: Información básica para médicos y pediatras*. Generalitat Valenciana.
- CARLI, P., A. BIGGERI and B. GIANNOTTI, 1995 Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* **32**: 734-739.
- CARLI, P., V. DE GIORGI, D. PALLI, V. GIANNOTTI and B. GIANNOTTI, 2000 Preoperative assessment of melanoma thickness by ABCD score of dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* **43**: 459-466.
- CLERGET-DARPOUX, F., 1998 Overview of strategies for complex genetic diseases. *Kidney Int* **53**: 1441-1445.
- CONDON, J. R., B. K. ARMSTRONG, A. BARNES and J. CUNNINGHAM, 2003 Cancer in Indigenous Australians: a review. *Cancer Causes Control* **14**: 109-121.
- CORACH, D., O. LAO, C. BOBILLO, K. VAN DER GAAG, S. ZUNIGA *et al.*, 2010 Inferring continental ancestry of argentineans from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Ann Hum Genet* **74**: 65-76.
- CORANDER, J., P. WALDMANN and M. J. SILLANPAA, 2003 Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* **163**: 367-374.
- COSTIN, G. E., J. C. VALENCIA, W. D. VIEIRA, M. L. LAMOREUX and V. J. HEARING, 2003 Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J Cell Sci* **116**: 3203-3212.
- CRESS, R. D., and E. A. HOLLY, 1997 Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: an analysis of california cancer registry data, 1988-93. *Cancer Causes Control* **8**: 246-252.
- CHAKRABORTY, R., and K. M. WEISS, 1988 Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9119-9123.
- CHANG, Y. M., J. A. NEWTON-BISHOP, D. T. BISHOP, B. K. ARMSTRONG, V. BATAILLE *et al.*, 2009 A pooled analysis of melanocytic nevus phenotype and the risk of cutaneous melanoma at different latitudes. *Int J Cancer* **124**: 420-428.
- CHUDNOVSKY, Y., P. A. KHAVARI and A. E. ADAMS, 2005 Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* **115**: 813-824.
- DALZIEL, M., M. KOLESNICHENKO, R. P. DAS NEVES, F. IBORRA, C. GODING *et al.*, 2010 Alpha-MSH regulates intergenic splicing of MC1R and TUBB3 in human melanocytes. *Nucleic Acids Res* **39**: 2378-2392.
- DARVASI, A., and S. SHIFMAN, 2005 The beauty of admixture. *Nat Genet* **37**: 118-119.

- DARWIN, C., 1871 *The descent of man*. Murray, Londres.
- DE VRIES, E., and J. W. COEBERGH, 2004 Cutaneous malignant melanoma in Europe. *Eur J Cancer* **40**: 2355-2366.
- DENKLER, K., and J. JOHNSON, 1999 A lost piece of melanoma history. *Plast Reconstr Surg* **104**: 2149-2153.
- DENNIS, L. K., L. E. BEANE FREEMAN and M. J. VANBEEK, 2003 Sunscreen use and the risk for melanoma: a quantitative review. *Ann Intern Med* **139**: 966-978.
- DIEPGEN, T. L., and V. MAHLER, 2002 The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* **146 Suppl 61**: 1-6.
- DORION-BONNET, F., S. MAUTALEN, I. HOSTEIN and M. LONGY, 1995 Allelic imbalance study of 16q in human primary breast carcinomas using microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer* **14**: 171-181.
- DUFFY, D. L., N. F. BOX, W. CHEN, J. S. PALMER, G. W. MONTGOMERY *et al.*, 2004 Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum Mol Genet* **13**: 447-461.
- DUFFY, D. L., Z. Z. ZHAO, R. A. STURM, N. K. HAYWARD, N. G. MARTIN *et al.*, 2010 Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* **130**: 520-528.
- DURAY, P. H., and M. S. ERNSTOFF, 1987 Dysplastic nevus in histologic contiguity with acquired nonfamilial melanoma. Clinicopathologic experience in a 100-bed hospital. *Arch Dermatol* **123**: 80-84.
- EASTON, D. F., and R. A. EELES, 2008 Genome-wide association studies in cancer. *Hum Mol Genet* **17**: R109-115.
- ELWOOD, J. M., R. P. GALLAGHER, G. B. HILL and J. C. PEARSON, 1985 Cutaneous melanoma in relation to intermittent and constant sun exposure--the Western Canada Melanoma Study. *Int J Cancer* **35**: 427-433.
- ELWOOD, J. M., and J. JOPSON, 1997 Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* **73**: 198-203.
- FALUSH, D., M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD, 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.
- FEJERMAN, L., E. M. JOHN, S. HUNTSMAN, K. BECKMAN, S. CHOUDHRY *et al.*, 2008 Genetic ancestry and risk of breast cancer among U.S. Latinas. *Cancer Res* **68**: 9723-9728.
- FERLAY, J., H. R. SHIN, F. BRAY, D. FORMAN, C. MATHERS *et al.*, 2010 Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-2917.
- FERLAY, J., F. PISANI and D. M. P. PARKIN, 2004 Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 2.0. IARC CancerBase no 5. Lyon: IARC Press.
- FERNANDEZ, L., R. MILNE, J. BRAVO, J. LOPEZ, J. AVILES *et al.*, 2007 MC1R: three novel variants identified in a malignant melanoma association study in the Spanish population. *Carcinogenesis* **28**: 1659-1664.
- FERNANDEZ, L. P., R. L. MILNE, G. PITA, J. A. AVILES, P. LAZARO *et al.*, 2008 SLC45A2: a novel malignant melanoma-associated gene. *Hum Mutat* **29**: 1161-1167.
- FERNANDEZ, L. P., R. L. MILNE, G. PITA, U. FLORISTAN, E. SENDAGORTA *et al.*, 2009 Pigmentation-related genes and their implication in malignant melanoma susceptibility. *Exp Dermatol* **18**: 634-642.

- FITZPATRICK, T. B., 1988 The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* **124**: 869-871.
- FLAHERTY, K. T., 2006 Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* **12**: 2366s-2370s.
- FLANAGAN, N., E. HEALY, A. RAY, S. PHILIPS, C. TODD *et al.*, 2000 Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet* **9**: 2531-2537.
- FRANDBERG, P. A., M. DOUFEXIS, S. KAPAS and V. CHHAJLANI, 1998 Human pigmentation phenotype: a point mutation generates nonfunctional MSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 490-492.
- FRAZER, K. A., S. S. MURRAY, N. J. SCHORK and E. J. TOPOL, 2009 Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* **10**: 241-251.
- FREEDMAN, M. L., C. A. HAIMAN, N. PATTERSON, G. J. McDONALD, A. TANDON *et al.*, 2006 Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14068-14073.
- GANDINI, S., F. SERA, M. S. CATTARUZZA, P. PASQUINI, O. PICCONI *et al.*, 2005a Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* **41**: 45-60.
- GANDINI, S., F. SERA, M. S. CATTARUZZA, P. PASQUINI, R. ZANETTI *et al.*, 2005b Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* **41**: 2040-2059.
- GANTZ, I., T. YAMADA, T. TASHIRO, Y. KONDA, Y. SHIMOTO *et al.*, 1994 Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 (alpha-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24.3 by Fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **19**: 394-395.
- GARBE, C., and A. BLUM, 2001 Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14**: 280-290.
- GARCIA-BORRON, J. C., B. L. SANCHEZ-LAORDEN and C. JIMENEZ-CERVANTES, 2005 Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* **18**: 393-410.
- GARCÍA GUAL, C., 1983 *Tratados Hipocráticos*. Gredos SA, Madrid.
- GASCUE, C., A. MIMBACAS, M. SANS, J. P. GALLINO, B. BERTONI *et al.*, 2005 Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. *Hum Biol* **77**: 873-878.
- GERGER, A., S. KOLLER, T. KERN, C. MASSONE, K. STEIGER *et al.*, 2005 Diagnostic applicability of in vivo confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors. *J Invest Dermatol* **124**: 493-498.
- GERSTENBLITH, M. R., A. M. GOLDSTEIN, M. C. FARGNOLI, K. PERIS and M. T. LANDI, 2007 Comprehensive evaluation of allele frequency differences of MC1R variants across populations. *Hum Mutat* **28**: 495-505.
- GILCHREST, B. A., M. S. ELLER, A. C. GELLER and M. YAAR, 1999 The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* **340**: 1341-1348.
- GONZALEZ BARÓN, M., 1998 *Factores pronósticos* Masson SA, Barcelona.
- GRAF, J., R. HODGSON and A. VAN DAAL, 2005 Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. *Hum Mutat* **25**: 278-284.

- GUDBJARTSSON, D. F., P. SULEM, S. N. STACEY, A. M. GOLDSTEIN, T. RAFNAR *et al.*, 2008 ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet* **40**: 886-891.
- HALPERN, A. C., D. T. GUERRY, D. E. ELDER, B. TROCK, M. SYNNESTVEDT *et al.*, 1993 Natural history of dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* **29**: 51-57.
- HAMBERG, A. P., C. M. KORSE, J. M. BONFRER and G. C. DE GAST, 2003 Serum S100B is suitable for prediction and monitoring of response to chemoimmunotherapy in metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* **13**: 45-49.
- HAN, J., G. A. COLDITZ and D. J. HUNTER, 2006 Risk factors for skin cancers: a nested case-control study within the Nurses' Health Study. *Int J Epidemiol* **35**: 1514-1521.
- HEALY, E., 2004 Melanocortin 1 receptor variants, pigmentation, and skin cancer susceptibility. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **20**: 283-288.
- HEALY, E., C. TODD, I. J. JACKSON, M. BIRCH-MACHIN and J. L. REES, 1999 Skin type, melanoma, and melanocortin 1 receptor variants. *J Invest Dermatol* **112**: 512-513.
- HERRERA SAVAL, A., and S. F. MARÍA, 2001 Factores pronósticos del melanoma. *Dermatología* **14**.
- HIDALGO, P. C. B., M.; ABILLEIRA, D; CABRERA, A; ALVAREZ, I, 2005 Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYPA, HBG, GC and D7S8. *Int J Hum Genet* **5**: 217-222.
- HILL, H. Z., W. LI, P. XIN and D. L. MITCHELL, 1997 Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res* **10**: 158-161.
- HIRSCHHORN, J. N., K. LOHMEYER, E. BYRNE and K. HIRSCHHORN, 2002 A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* **4**: 45-61.
- HOGGART, C. J., E. J. PARRA, M. D. SHRIVER, C. BONILLA, R. A. KITTLES *et al.*, 2003 Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* **72**: 1492-1504.
- HONGBO, W., and Y. CHUNHONG, 2011 A Small-Molecule p53 Activator Induces Apoptosis through Inhibiting MDMX Expression in Breast Cancer Cells. *Neoplasia* **13**: 611-619.
- HUSSUSSIAN, C. J., J. P. STRUEWING, A. M. GOLDSTEIN, P. A. HIGGINS, D. S. ALLY *et al.*, 1994 Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* **8**: 15-21.
- HUTTON, S. M., and R. A. SPRITZ, 2008 Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-Hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *J Invest Dermatol* **128**: 2442-2450.
- IBARROLA-VILLAVA, M., L. P. FERNANDEZ, G. PITA, J. BRAVO, U. FLORISTAN *et al.*, 2010 Genetic analysis of three important genes in pigmentation and melanoma susceptibility: CDKN2A, MC1R and HERC2/OCA2. *Exp Dermatol* **19**: 836-844.
- IM, S., O. MORO, F. PENG, E. E. MEDRANO, J. CORNELIUS *et al.*, 1998 Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res* **58**: 47-54.
- IOZUMI, K., G. E. HOGANSON, R. PENNELLA, M. A. EVERETT and B. B. FULLER, 1993 Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* **100**: 806-811.
- IZAGIRRE, N., I. GARCIA, C. JUNQUERA, C. DE LA RUA and S. ALONSO, 2006 A scan for signatures of positive selection in candidate loci for skin pigmentation in humans. *Mol Biol Evol* **23**: 1697-1706.

- JABLONSKI, N. G., and G. CHAPLIN, 2000 The evolution of human skin coloration. *J Hum Evol* **39**: 57-106.
- JOHNS, M. M., 3RD, W. H. WESTRA, J. A. CALIFANO, D. EISELE, W. M. KOCH *et al.*, 1996 Allelotype of salivary gland tumors. *Cancer Res* **56**: 1151-1154.
- JONES, W. O., C. R. HARMAN, A. K. NG and J. H. SHAW, 1999 Incidence of malignant melanoma in Auckland, New Zealand: highest rates in the world. *World J Surg* **23**: 732-735.
- JOUHILAHTI, E. M., S. PELTONEN and J. PELTONEN, 2008 Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. *J Histochem Cytochem* **56**: 1113-1119.
- KADEKARO, A. L., S. LEACHMAN, R. J. KAVANAGH, V. SWOPE, P. CASSIDY *et al.*, 2010 Melanocortin 1 receptor genotype: an important determinant of the damage response of melanocytes to ultraviolet radiation. *FASEB J* **24**: 3850-3860.
- KANETSKY, P. A., J. SWOYER, S. PANOSSIAN, R. HOLMES, D. GUERRY *et al.*, 2002 A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *Am J Hum Genet* **70**: 770-775.
- KATALINIC, A. K., U; SCHAFER, T, 2003 Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol*. **149**: 1200-1206.
- KATSETOS, C. D., M. M. HERMAN and S. J. MORK, 2003 Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* **55**: 77-96.
- KEFFORD, R., J. N. BISHOP, M. TUCKER, B. BRESSAC-DE PAILLERETS, G. BIANCHI-SCARRA *et al.*, 2002 Genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol* **3**: 653-654.
- KENNEDY, C., J. TER HUURNE, M. BERKHOUT, N. GRUIS, M. BASTIAENS *et al.*, 2001 Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* **117**: 294-300.
- KOH, H. K., B. E. KLIGLER and R. A. LEW, 1990 Sunlight and cutaneous malignant melanoma: evidence for and against causation. *Photochem Photobiol* **51**: 765-779.
- KONSTADOUKAKIS, M. M., E. MESSARIS, G. ZOGRAFOS, N. RICANIADIS, G. ANDROULAKIS *et al.*, 2002 Common prognostic factors for stage III melanoma patients and for stage I and II melanoma patients with recurrence to their regional lymph nodes. *Melanoma Res* **12**: 357-364.
- KULLAVANIJAYA, P., and H. W. LIM, 2005 Photoprotection. *J Am Acad Dermatol* **52**: 937-958; quiz 959-962.
- LAMASON, R. L., M. A. MOHIDEEN, J. R. MEST, A. C. WONG, H. L. NORTON *et al.*, 2005 SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* **310**: 1782-1786.
- LANDER, E. S., and N. J. SCHORK, 1994 Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**: 2037-2048.
- LANDI, M. T., P. A. KANETSKY, S. TSANG, B. GOLD, D. MUNROE *et al.*, 2005 MC1R, ASIP, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population. *J Natl Cancer Inst* **97**: 998-1007.
- LANG, P. G., 2002 Current concepts in the management of patients with melanoma. *Am J Clin Dermatol* **3**: 401-426.

- LARRE BORGES, A., F. CUELLAR, J. A. PUIG-BUTILLE, M. SCARONE, L. DELGADO *et al.*, 2009 CDKN2A mutations in melanoma families from Uruguay. *Br J Dermatol* **161**: 536-541.
- LE HELLARD, S., S. J. BALLEREAU, P. M. VISSCHER, H. S. TORRANCE, J. PINSON *et al.*, 2002 SNP genotyping on pooled DNAs: comparison of genotyping technologies and a semi automated method for data storage and analysis. *Nucleic Acids Res* **30**: e74.
- LENS, M. B., and M. DAWES, 2004 Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* **150**: 179-185.
- LINS, T. C., R. G. VIEIRA, B. S. ABREU, D. GRATTAPAGLIA and R. W. PEREIRA, 2010 Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* **22**: 187-192.
- LIU, H., B. WANG and C. HAN, 2011 Meta-analysis of genome-wide and replication association studies on prostate cancer. *Prostate* **71**: 209-224.
- LORIA, D., and E. MATOS, 2001 Risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study in Argentina. *Int J Dermatol* **40**: 108-114.
- MACKIE, R. M., and T. AITCHISON, 1982 Severe sunburn and subsequent risk of primary cutaneous malignant melanoma in scotland. *Br J Cancer* **46**: 955-960.
- MACKIE, R. M., T. FREUDENBERGER and T. C. AITCHISON, 1989 Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet* **2**: 487-490.
- MANCINI, F., G. DI CONZA, O. MONTI, A. MACCHIARULO, R. PELLICCIARI *et al.*, 2010 Puzzling over MDM4-p53 network. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 1080-1083.
- MANSSON-BRAHME, E., H. JOHANSSON, O. LARSSON, L. E. RUTQVIST and U. RINGBORG, 2002 Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. *Acta Oncol* **41**: 138-146.
- MARESCA, V., E. FLORI, B. BELLEI, N. ASPITE, D. KOVACS *et al.*, 2010 MC1R stimulation by alpha-MSH induces catalase and promotes its re-distribution to the cell periphery and dendrites. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**: 263-275.
- MARTÍNEZ ASUAGA, M., A. MENÉNDEZ MOLINA, A. LARRE BORGES, J. BRUNO CAMPAÑA, C. BAZZANO PEREZ *et al.*, 2003 Dermatoscopia en lesiones melanocíticas: propuesta de puntos críticos de corte de score dermatoscópico total para el diagnóstico oportuno de melanoma. *Rev Med Uruguay* **19**: 225-230.
- MCEVOY, B., S. BELEZA and M. D. SHRIVER, 2006 The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**: R176-181.
- MCKEIGUE, P. M., 1998 Mapping genes that underlie ethnic differences in disease risk: methods for detecting linkage in admixed populations, by conditioning on parental admixture. *Am J Hum Genet* **63**: 241-251.
- MCKEIGUE, P. M., J. R. CARPENTER, E. J. PARRA and M. D. SHRIVER, 2000 Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations. *Ann Hum Genet* **64**: 171-186.
- MILLER, A. J., and M. C. MIHM, JR., 2006 Melanoma. *N Engl J Med* **355**: 51-65.
- MORI, Y. M., M. ABE, T. FUKUSHIGE, S. MIURA, K. SUNAMURA, M. SHIIBA, K. SATO, M. NUKIWA, T. HORII, A., 1999 Chromosome band 16q24 is frequently deleted in human gastric cancer. *Br J Cancer*: 7.
- MORONE, G., F. MERIGGI and E. FORNI, 1998 [The surgery of lung metastases of melanoma]. *Ann Ital Chir* **69**: 461-464.

- MYLES, S., M. SOMEL, K. TANG, J. KELSO and M. STONEKING, 2007 Identifying genes underlying skin pigmentation differences among human populations. *Hum Genet* **120**: 613-621.
- NAN, H., P. KRAFT, D. J. HUNTER and J. HAN, 2009 Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. *Int J Cancer* **125**: 909-917.
- NEWTON-CHEH, C., and J. N. HIRSCHHORN, 2005 Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res* **573**: 54-69.
- NISHIDA, N., Y. FUKUDA, H. KOKURYU, T. SADAMOTO, G. ISOWA *et al.*, 1992 Accumulation of allelic loss on arms of chromosomes 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **51**: 862-868.
- OCANA-RIOLA, R., C. MARTINEZ-GARCIA, S. SERRANO, A. BUENDIA-EISMAN, C. RUIZ-BAENA *et al.*, 2001 Population-based study of cutaneous malignant melanoma in the Granada province (Spain), 1985-1992. *Eur J Epidemiol* **17**: 169-174.
- ODDONE, J. A., 1966 *La Emigración Europea al Río de La Plata*, Montevideo.
- ORTIZ, B., C. VAZQUEZ, C. MARTINEZ, J. GIMENEZ, O. SANMARTIN *et al.*, 2003 [S100 protein as tumoral marker in melanoma patients. Comparative study with sentinel node biopsy and whole body FDG-PET]. *Rev Esp Med Nucl* **22**: 87-96.
- PALMER, J. S., D. L. DUFFY, N. F. BOX, J. F. AITKEN, L. E. O'GORMAN *et al.*, 2000 Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* **66**: 176-186.
- PARKER, S. L., T. TONG, S. BOLDEN and P. A. WINGO, 1996 Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* **46**: 5-27.
- PARKIN, D. M., F. BRAY, J. FERLAY and P. PISANI, 2005 Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.
- PARRA, E. J., 2010 Evolución de la pigmentación en la especie humana. *Piel* **2**: 13.
- PATTERSON, N., HATTANGADI, N. LANE, B. LOHMUELLER, K.E. HAFLER, D., J. R. H. OKSENBERG, S.L. SMITH, M.W. O'BRIEN, S.J. and D. D. ALTSHULER, M.J. AND REICH, D., 2004 Methods for High-Density Admixture Mapping of Disease Genes. *Am. J. Hum. Genet* **74**.
- PHO, L., D. GROSSMAN and S. A. LEACHMAN, 2006 Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opin Oncol* **18**: 173-179.
- PORCIA, T., 2009 Skin Cancer in Skin of Color *Dermatol Nurs* **4**: 8.
- PRIARIO, J. C., 2005 *Historia del melanoma maligno en Uruguay*, Montevideo.
- PRICE, A. L., J. BUTLER, N. PATTERSON, C. CAPELLI, V. L. PASCALI *et al.*, 2008 Discerning the ancestry of European Americans in genetic association studies. *PLoS Genet* **4**: e236.
- PRICE, A. L., N. PATTERSON, F. YU, D. R. COX, A. WALISZEWSKA *et al.*, 2007 A genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet* **80**: 1024-1036.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS and P. DONNELLY, 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- RAIMONDI, S., F. SERA, S. GANDINI, S. IODICE, S. CAINI *et al.*, 2008 MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* **122**: 2753-2760.
- RAO, D. C., 2001 Genetic dissection of complex traits: an overview. *Adv Genet* **42**: 13-34.

- REES, J. L., 2003 Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* **37**: 67-90.
- REICH, D., N. PATTERSON, V. RAMESH, P. L. DE JAGER, G. J. McDONALD *et al.*, 2007 Admixture mapping of an allele affecting interleukin 6 soluble receptor and interleukin 6 levels. *Am J Hum Genet* **80**: 716-726.
- RHODES, A. R., T. J. HARRIST, C. L. DAY, M. C. MIHM, JR., T. B. FITZPATRICK *et al.*, 1983 Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol* **9**: 563-574.
- RIENER, M. O., E. NIKOLOPOULOS, A. HERR, P. J. WILD, M. HAUSMANN *et al.*, 2008 Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13 locus on 16q. *Hum Pathol* **39**: 1621-1629.
- RIZOS, H., A. P. DARMANIAN, E. A. HOLLAND, G. J. MANN and R. F. KEFFORD, 2001a Mutations in the INK4a/ARF melanoma susceptibility locus functionally impair p14ARF. *J Biol Chem* **276**: 41424-41434.
- RIZOS, H., S. PUIG, C. BADENAS, J. MALVEHY, A. P. DARMANIAN *et al.*, 2001b A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene* **20**: 5543-5547.
- RUIZ LASCANO, A., R. KUZNITZKY, E. CUESTAS, C. MAINARDI, R. ALBERTINI *et al.*, 2004 [Risk factors for cutaneous melanoma: case-control study in Cordoba, Argentina]. *Medicina (B Aires)* **64**: 504-508.
- SANCHEZ-LAORDEN, B. L., C. JIMENEZ-CERVANTES and J. C. GARCIA-BORRÓN, 2007 Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer. *J Biol Chem* **282**: 3241-3251.
- SANS, M., 2000 Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. *Hum Biol* **72**: 155-177.
- SANS, M., F. M. SALZANO and R. CHAKRABORTY, 1997 Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* **69**: 161-170.
- SANS, M., M.-G. F and K. R., 1986 Presencia de mancha mongólica en recién nacidos de Montevideo. *Archivos de Pediatría del Uruguay* **57**: 149-156.
- SANS, M., M.-G. F and K. R., 1991a La mancha mongólica como indicador racial en Montevideo. *Acta Genetica Clinica et Teratologica* **1**: 72-85.
- SANS, M., M.-G. F and K. R., 1991b Utilización de marcadores genéticos para el estudio de mestizaje en la población uruguaya. *Antropología Biológica* **1**: 72-85.
- SANTOS, N. P., E. M. RIBEIRO-RODRIGUES, A. K. RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. PEREIRA, L. GUSMAO *et al.*, 2010 Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* **31**: 184-190.
- SATO, T., A. TANIGAMI, K. YAMAKAWA, F. AKIYAMA, F. KASUMI *et al.*, 1990 Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* **50**: 7184-7189.
- SCHERER, D., and R. KUMAR, 2010 Genetics of pigmentation in skin cancer--a review. *Mutat Res* **705**: 141-153.
- SCHERER, D., E. NAGORE, J. L. BERMEJO, A. FIGL, R. BOTELLA-ESTRADA *et al.*, 2009 Melanocortin receptor 1 variants and melanoma risk: a study of 2 European populations. *Int J Cancer* **125**: 1868-1875.

- SCHIOTH, H. B., S. R. PHILLIPS, R. RUDZISH, M. A. BIRCH-MACHIN, J. E. WIKBERG *et al.*, 1999 Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun* **260**: 488-491.
- SCHNETKAMP, P. P., 2004 The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. *Pflugers Arch* **447**: 683-688.
- SCHWARTZ, A. G., A. S. WENZLAFF, C. H. BOCK, J. J. RUTERBUSCH, W. CHEN *et al.*, 2011 Admixture mapping of lung cancer in 1812 African-Americans. *Carcinogenesis* **32**: 312-317.
- SHLUSH, L. I., S. BERCOVICI, W. G. WASSER, G. YUDKOVSKY, A. TEMPLETON *et al.*, 2010 Admixture mapping of end stage kidney disease genetic susceptibility using estimated mutual information ancestry informative markers. *BMC Med Genomics* **3**: 47.
- SHRIVER, M. D., E. J. PARRA, S. DIOS, C. BONILLA, H. NORTON *et al.*, 2003 Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet* **112**: 387-399.
- SIEGEL, R., DEEPA NAISHADHAM and M. A. JEMAL, 2012 Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN* **0**
- SMITH, R., E. HEALY, S. SIDDIQUI, N. FLANAGAN, P. M. STEIJLEN *et al.*, 1998 Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Dermatol* **111**: 119-122.
- SOLE, X., E. GUINO, J. VALLS, R. INIESTA and V. MORENO, 2006 SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**: 1928-1929.
- SORTINO-RACHOU, A. M., M. P. CURADO and C. CANCELA MDE, 2011 Cutaneous melanoma in Latin America: a population-based descriptive study. *Cad Saude Publica* **27**: 565-572.
- STRACCI, F., L. MINELLI, D. D'ALO, I. FUSCO-MOFFA, E. FALSETTINI *et al.*, 2005 Incidence, mortality and survival trends of cutaneous melanoma in Umbria, Italy. 1978-82 and 1994-98. *Tumori* **91**: 6-8.
- STURM, R. A., D. L. DUFFY, N. F. BOX, R. A. NEWTON, A. G. SHEPHERD *et al.*, 2003 Genetic association and cellular function of MC1R variant alleles in human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* **994**: 348-358.
- SUAREZ, H. G., MERNIES, 1937 Melanoma maligno metásticos. *Bol Soc Cir Urug* **8**.
- SUZUKI, I., A. TADA, M. M. OLLMANN, G. S. BARSH, S. IM *et al.*, 1997 Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol* **108**: 838-842.
- SWERDLOW, A. J., and A. GREEN, 1987 Melanocytic naevi and melanoma: an epidemiological perspective. *Br J Dermatol* **117**: 137-146.
- TADA, A., I. SUZUKI, S. IM, M. B. DAVIS, J. CORNELIUS *et al.*, 1998 Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ* **9**: 575-584.
- TUCKER, M. A., A. HALPERN, E. A. HOLLY, P. HARTGE, D. E. ELDER *et al.*, 1997 Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* **277**: 1439-1444.
- URTEAGA, O., and G. T. PACK, 1966 On the antiquity of melanoma. *Cancer* **19**: 607-610.
- VALVERDE, P., E. HEALY, I. JACKSON, J. L. REES and A. J. THODY, 1995 Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* **11**: 328-330.

- VALVERDE, P., E. HEALY, S. SIKKINK, F. HALDANE, A. J. THODY *et al.*, 1996 The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* **5**: 1663-1666.
- VASALLO, J. B., R; BIDEGAIN. M; MUSÉ, I; ESPASANDÍN, J; DE BONI, D; LEVIN, R; GARCÉS, M; VERCELLI, J; ELTERS, E; PRIARIO, J; MARTÍNEZ, M; RONCO, A, 1997 Melanoma. *Lucha contra el cáncer* **1**.
- VOLLMER, R. T., 1989 Malignant melanoma. A multivariate analysis of prognostic factors. *Pathol Annu* **24 Pt 1**: 383-407.
- VOLLMERS, H. P., and W. BIRCHMEIER, 1983 Monoclonal antibodies that prevent adhesion of B 16 melanoma cells and reduce metastases in mice: crossreaction with human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 6863-6867.
- WHEATLEY, K., N. IVES, B. HANCOCK, M. GORE, A. EGGERMONT *et al.*, 2003 Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev* **29**: 241-252.
- WHITEMAN, D. C., C. A. WHITEMAN and A. C. GREEN, 2001 Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* **12**: 69-82.
- WONG, T. H., and J. L. REES, 2005 The relation between melanocortin 1 receptor (MC1R) variation and the generation of phenotypic diversity in the cutaneous response to ultraviolet radiation. *Peptides* **26**: 1965-1971.
- WOOD, L. D., E. S. CALHOUN, N. SILLIMAN, J. PTAK, S. SZABO *et al.*, 2006 Somatic mutations of GUCY2F, EPHA3, and NTRK3 in human cancers. *Hum Mutat* **27**: 1060-1061.
- ZHU, X., A. LUKE, R. S. COOPER, T. QUERTERMOUS, C. HANIS *et al.*, 2005 Admixture mapping for hypertension loci with genome-scan markers. *Nat Genet* **37**: 177-181.
- ZUKER, M., 2003 Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.

ANEXO

ANEXO I

I.1. DISEÑO DE CEBADORES INTERNOS PARA REALIZAR LA REACCIÓN DE SNAPSHOT

-

| Cebadores internos | Secuencia |
|---------------------------|-----------------------------------|
| MIAs | |
| <i>SLC24A5sn</i> | 5'TGTCTCAGGATGTTGCAGGC3' |
| <i>TSC111025sn</i> | 5'CTCTCGATGAGTAAATATGGG3' |
| <i>GC1Fsn</i> | 5'GTTCCGTGGGTGTGGC3' |
| MC1-R | |
| <i>R151C sn</i> | 5'CTACATCTCCATCTTCTACGCACTG3' |
| <i>R160W sn</i> | 5'AAAAAAAAACGGCTCGCCGCGCCC3' |
| <i>D294H sn</i> | 5'TCGCCCTCATCATCTGCAATGCCATCATC3' |

I.2. CEBADORES PARA EL PCR MULTIPLEX SLC24A5, TSC111025, GC1F Y
PARA MC1-R

TSC111025 (D) 5'ATGAAGGACCTCTCTGTGTGCAGT3'

TSC111025 (R) 5'GCTGTGAGGACGTCAAACCTCTTT3'

GC1F (D) 5'AGATCTGAAATGGCTATTATTTTG3'

GC1F (R) 5'GGAGGTGAGTTTATGGAACAGC3

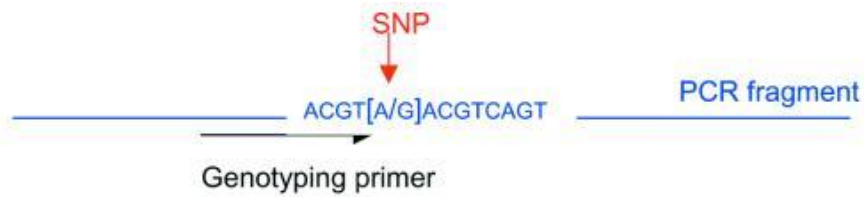
SLC24A5 (D) 5'GATTGTCTCAGGATGTTGCAGG3'

SLC24A5 (R) 5'GATCCAAGGATGGTGCTAATGC3'

MC1-R (D) 5'CAACGACTCCTTCCTGCTTC3'

MC1-R (R) 5'TGCCCAGCACACTTAAAGC3'

II.1. TÉCNICA DE SNAPSHOT



| | SNaPshot™ |
|---|--|
| Reaction mix (enzyme, buffer) | Labelled ddNTPs: ddATP ddCTP ddGTP ddTTP |
| Extension product for allele A | —————▶ ddT |
| Extension product for allele G | —————▶ ddC |
| Output for an heterozygote P: unextended primer A: peak for allele A G: peak for allele G | |

II.2 REACCIÓN DE SNAPSHOT

1. Lavado del producto de PCR

| | |
|---------------------------|--------|
| Producto de PCR | 4µl |
| SAP (fosfatasa) (1unidad) | 1 µl |
| <i>ExoI</i> (4unidades) | 0.2 µl |

Luego se incuba a 37°C durante una hora y se inactiva la enzima a 85°C.

2. Reacción de SNaPshot

| | |
|----------------------------------|------|
| Mezcla de reacción del SNaPshot | 2 µl |
| Producto de PCR multiplex limpio | 2 µl |
| Mezcla de cebadores | 1 µl |
| Buffer ½ term. | 1 µl |
| Agua | 5 µl |

Además para llevar a cabo esta reacción se debe tener una reacción de control positivo y negativo la cual incluye:

| | |
|---------------------------------|------|
| Mezcla de reacción | 2 µl |
| Molde control | 2 µl |
| Mezcla de los cebadores control | 1 µl |
| Buffer ½ term. | 1 µl |
| Agua | 5 µl |

En el caso del control negativo contiene lo mismo que el control positivo excepto el agua, que lleva 7 μ l en vez de 5 μ l, dado que no contiene el molde de ADN.

La mezcla de reacción contiene la enzima, el buffer y los 4 ddNTPs marcados con diferentes colores. Durante la reacción los ddNTPs que corresponden al alelo que está presente se incorporan y su genotipo se visualiza como un pico de color. El ciclado para llevar a cabo esta reacción de SNaPshot fue el siguiente:

| | | | |
|------|---------|--|-----------|
| 95°C | 10 seg. | | 40 ciclos |
| 50°C | 5 seg. | | |
| 60°C | 30 seg. | | |

II.3. GENOTIPADO DE LOS MIAS POR PCR-RFLP

Corte con enzimas

TSC111025(C/T): enzima utilizada *HAEIII*:

Sitios de corte de la enzima: 126 y 148 pb (2 cortes) cuando está presente el alelo C.

Se obtienen tres fragmentos: 126 , 22, 98 pb.

Si está presente el alelo T en vez del C, la enzima corta solamente en 126 pb y se obtendrán fragmentos de 126 pb y 22 pb.

GC1F (T/G): enzima utilizada *HAEIII*:

Sitios de corte de la enzima: 121 pb cuando está presente el SNP (G)

Se obtienen dos fragmentos: 121, 79 pb.

SLC24A5(A/G): enzima utilizada *HhaI*:

Sitios de corte de la enzima: corta en el SNP (G) en 24 pb.

Se obtienen dos fragmentos de 196 pb y 24 pb.

Reacciones de digestión:

Digestión con *HAEIII*

| | |
|---|-------------|
| Enzima <i>HAEIII</i> 10 unidades/ μ l (Fermentas Molecular Biology Tools) | 0.5 μ l |
| Buffer R 10X | 1.5 μ l |
| Producto de PCR | 13 μ l |
| H ₂ O | |
| Vf | 15 μ l |

Digestión con *HhaI*

| | |
|---|-------------|
| Enzima <i>HhaI</i> 10 unidades/ μ l (Fermentas Molecular Biology Tools) | 0.5 μ l |
| Buffer 10X Tango | 1.0 μ l |
| Producto de PCR | 7 μ l |
| H ₂ O | 1.5 μ l |

Vf

10 μ l

Corrida electroforética

Limpieza de los vidrios:

SDS 0.1%

Agua

Etanol 100%

Gel de acrilamida al 6%

| | |
|------------------------------|-------------|
| 40% Acrilamida/Bisacrilamida | 1.5ml |
| TBE 10X | 1.0 ml |
| H2O dd | 7.39ml |
| APS 10% | 100 μ l |
| Temed | 5 μ l |
| Vf | 10ml |

Soluciones de revelado

Fijador:

10 ml de Etanol 95%

0.5 ml de Ácido acético

100 ml de H2O

Se deja al gel durante 20 minutos.

Tinción:

0.1 gr de AgNO_3 en 100 ml de agua

Se lava con agua y se lo deja durante 10 minutos en esta solución de tinción.

Revelador

5 gr de NaOH

1.35 ml de Formaldehído 37 %

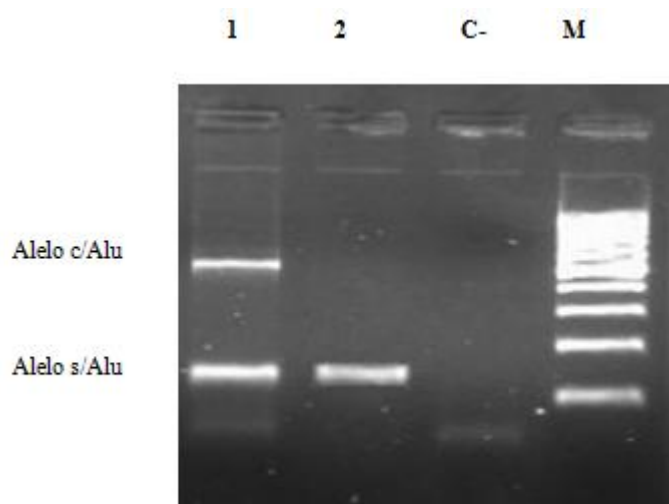
100 ml de H_2O

Se sumerge el gel y se lo deja hasta que aparezcan las bandas. Luego de que aparezcan las bandas, se coloca de nuevo el gel en la solución fijadora.

ANEXO III. OTRA INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

III.1. GENOTIPADO DE LOS MARCADORES ALU: PV92 Y APOA1

Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de PV92. 1: Individuo heterocigota 2: Individuo homocigota sin inserción; C- control negativo; M: marcador 100 pb.



En la figura se muestra una corrida electroforética en un gel de agarosa a una concentración del 2% de los productos de PCR del marcador PV92. El mismo es una inserción Alu, por lo que presentara dos fragmentos de distinto tamaño según el individuo sea portador de la inserción o no. Para este marcador, cuando presenta la inserción se visualiza en el gel un fragmento de 443 pb, y si no la presenta, se observa un fragmento de 129 pb. Para el caso del marcador APOA1 también fue genotipado mediante la técnica de PCR.

III.2. INFORMACIÓN GENÉTICA RESUMIDA DE LOS SNPS DEL GEN MC1-R Y TRES MUTACIONES RHC

| Gen | dbSNP RS ID | Alelos |
|--------------|-------------|--------|
| MC1R | rs3212363 | A/T |
| | rs8045560 | C/T |
| | rs2270459 | G/T |
| | rs3212346 | A/G |
| | rs 3212369 | A/G |
| <i>R151C</i> | rs 1805007 | C/T |
| <i>D294H</i> | rs 1805009 | C/G |
| <i>R160W</i> | rs 1805008 | C/T |

En la tabla se muestran las ocho variantes del gen MC1-R el cual codifica para el receptor de melanocortina encargado de llevar a cabo la síntesis de la melanina mediante la unión de la hormona alfa MSH. Dentro de éstas variantes, 3 son mutaciones que se denominan de tipo RHC (*R151C*, *D294H* y *R160W*) por generar un fenotipo de color de pelo pelirrojo baja capacidad de broncearse y una alta capacidad de quemarse al sol. Estas se encuentran localizadas en la región codificante del gen. Las restantes 5 variantes son tag-SNPs localizados en la región promotora del gen (rs 8045560, rs 2270459 y rs3212346) y en las regiones 5`UTR y 3`UTR (rs 3212363 y rs3212369 respectivamente). Las variantes que están en la región promotora se hallan a aproximadamente 5 Kb de distancia del gen MC1-R.

III.3. SECUENCIA DEL GEN MC1R MOSTRANDO LAS MUTACIONES RHC



MUTACIONES RHC

Mutación D294H: representada por S (G/C)

Mutación R151C: representada por B (G/A)

Mutación R160W :representada por Y (G/A).

III.4. FOTOTIPO: CRITERIOS PARA SU DEFINICIÓN

| FOTOTIPO | SEQUEMA? | SEBRONCEA? | COLOR PELO | TONO OJOS | TEZ |
|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|------------|
| Ft1 | Siempre | Nula | Pelirrojo | Claros | Blanca |
| Ft2 | Siempre | Regular | Rubio | Claros | Blanca |
| Ft3 | Frecuente | Bueno | Castaño | Oscuros | Blanca |
| Ft4 | Raramente | Muy buena | Negro | Oscuros | Blanca |
| Ft5 | Nunca | ... | Negro | Oscuros | Oscura |
| Ft6 | Nunca | ... | Negro | Oscuros | Negra |

