

POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS CON RESPUESTA A RADIACIÓN UV Y  
SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO

YURY CAROLINA ACOSTA VEGA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por al título de  
BIÓLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGÍA

2.010

POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS CON RESPUESTA A RADIACIÓN UV Y  
SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO

YURY CAROLINA ACOSTA VEGA

---

INGRID SCHULER MPhil.

Decana Académica  
Facultad de Ciencias

---

ANDREA FORERO

Directora Carrera de Biología  
Facultad de Ciencias

POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS CON RESPUESTA A RADIACIÓN UV Y SU  
RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO.

YURY CAROLINA ACOSTA VEGA

APROBADO

---

SANDRA RAMIREZ CLAVIJO Ph.D  
DIRECTORA

---

MARTHA BERMUDEZ Ph.D  
JURADO

---

NELSON RANGEL MSc.  
CODIRECTOR

## NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de grado, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora, su director de tesis y su codirector, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por hacerme cada día más fuerte de mente y corazón, y también por poner en mi camino personas tan importantes como son mi familia, amigos y compañeros.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque sé que procuran mi bienestar, y claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, no habría logrado todo lo que he logrado. A mi madre Bárbara por su apoyo incondicional durante mi formación personal y académica, además de su apoyo económico incondicional, que sin el cual mis estudios no habrían sido posibles. A mis hermanos Sandra, Natalia y Felipe, quienes me han enseñado que aunque la vida tiene momentos difíciles, siempre encontraré en ellos amistad, honestidad, confianza y personas únicas con las cuales reír y hacer que la vida sea más fácil.

De igual manera, a mi directora de trabajo de grado Dr Sandra Ramirez Clavijo quien desde un principio me recibió con una actitud amable y noble y a quien agradezco en primer lugar por contribuir en mi formación académica a través de la elaboración de mi trabajo de grado, y en segundo lugar agradezco porque fue alguien incondicional en los momentos que definieron la posibilidad de realizar mi tesis en la Universidad del Rosario bajo su dirección.

Así también, a mi codirector Nelson Rangel quien me enseñó todas las técnicas moleculares que hoy en día sé, también me enseñó a ser más ordenada en la presentación de mis informes, a ser metódica en el laboratorio y especialmente, porque siempre estuvo pendiente de mí durante el desarrollo del trabajo de grado.

Un agradecimiento especial a mi hermana Natalia, quien siempre supervisó mi trabajo y a quien agradezco toda la paciencia que me tuvo en el laboratorio, además le doy las gracias por todas las veces que me aconsejó y me corrigió ya que siempre fueron precisas.

A la Dr Sandra escobar, por su oportuna supervisión en la parte estadística durante los momentos de desesperación y angustia.

De igual Forma a la Universidad del Rosario por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de grado en sus instalaciones, y junto con la U.D.C.A que financiaron el proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de biología molecular y celular de la universidad del Rosario, especialmente Natalia Acosta, Milena Galvis, Sally Lorena, Lina Quijano, Maria Alejandra, Lida Tribiño, Cesar Payan y Juan Cediél, quienes hicieron del laboratorio un lugar realmente agradable y divertido para trabajar.

A mis amigos de la Universidad Javeriana especialmente Carolina Cocomá, Johanna Alfonso, Jennyfer Aldana, Laura Beltrán y Joaquín Celeita con quienes disfrute la universidad al máximo.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	2
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 Melanoma Maligno.....	6
3.2 Receptor de Melanocortina (MC1R).....	7
3.3 Melanogénesis.....	8
3.4 Radiación Solar.....	11
3.5 Vía de Reparación Por Escisión de Nucleótidos (NER).....	11
4. OBJETIVOS.....	13
4.1 General.....	13
4.2 Específico.....	13
5. METODOLOGÍA.....	14
5.1 Tipo de Estudio.....	14
5.2 Población de Estudio.....	14
5.3 Procedimiento de Muestreo.....	14
5.3.1 Recolección de la Información.....	15
5.4 Técnicas y Procedimientos.....	15
5.4.1 Extracción de ADN.....	15
5.4.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	16
5.4.3 Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs).....	17
5.4.4 Verificación en Gel de agarosa.....	17
6.RESULTADOS .....	17
6.1 PCR.....	17
6.1.1 MC1R.....	17
6.1.2 XPD.....	18
6.2 RFLPS.....	18
6.2.1 MC1R.....	18
6.2.2 XPD.....	19
6.3 Análisis Descriptivo.....	19
6.3.1 Casos.....	19

6.3.2 Controles.....	20
6.4 Análisis Bivariado.....	20
6.4.1 XPD.....	20
6.4.2 MC1R.....	22
6.5 Análisis Multivariado.....	24
6.5.1 XPD.....	24
6.5.2 MC1R.....	24
7. DISCUSIÓN.....	25
8. CONCLUSIONES.....	29
9. RECOMENDACIONES.....	29
10. BIBLIOGRAFIA.....	30
ANEXOS	



## RESUMEN

En Colombia, de acuerdo a datos publicados por el Instituto Nacional de Cancerología, en el año 2007 el tipo de cáncer más frecuente fue el de piel con 895 casos nuevos, seguido por cáncer de cuello uterino y cáncer de próstata con 529 y 386 casos nuevos respectivamente. De los 895 casos 97 fueron de melanoma maligno cutáneo (MMC), siendo considerado el tercer tipo de cáncer de piel, después del carcinoma de células basales (481 casos) y carcinoma de células escamosas (134 casos), estas neoplasias presentan una mortalidad muy baja y rara vez hacen metástasis, contrario a lo que sucede en melanoma maligno cutáneo donde la mortalidad y el potencial metastático son altos. Actualmente se cree que más del 65% de los melanomas podrían estar relacionados con exposición solar intensa intermitente, particularmente durante la infancia (Armstrong, B.K and Kricker, A. 1993). Dado que la exposición incrementada a la radiación ultravioleta es considerada como el principal factor ambiental que contribuye al desarrollo de MMC, es probable pensar que polimorfismos en genes que codifican para proteínas que juegan un rol en la reparación de daño al ADN ocasionado por UVB como por ejemplo XPD y polimorfismos del gene MC1R, que regula procesos de pigmentación, sean variantes alélicas que puedan estar confiriendo susceptibilidad al desarrollo de MMC. Las variantes que fueron estudiadas se ubican en los codones Lys751Gln (XPD) y Arg151Cys (MC1R). Éstas variantes alélicas fueron estudiadas en 184 individuos colombianos, de los cuales 92 individuos fueron casos y 92 controles (análisis pareado de casos-contróles relación 1:1). No se encontró asociación entre la presencia del polimorfismo Lys751Gln del gen XPD y el desarrollo de melanoma maligno cutáneo (Gln/Gln  $P=0.865$ ,  $IC_{95\%}=0.270-4.75$ ; Lys/Gln  $P=0.272$   $IC_{95\%}=0.762-2,629$ ). De igual manera, no se encontró asociación entre la presencia del polimorfismo Arg151Cys del gen MC1R y el desarrollo de melanoma maligno cutáneo (Cys/Cys  $P=1$ ,  $IC_{95\%}=0.0-1$ ; Arg/Cys  $P=0.139$ ,  $IC_{95\%}=0.92-1.395$ ).

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el melanoma maligno cutáneo no es un tumor muy frecuente, sin embargo en los últimos años se ha observado que su incidencia ha incrementado rápidamente, hasta el punto de considerar a esta enfermedad, en algunos países, un problema de salud pública, principalmente en países occidentales, habitados por población de raza blanca (Pérez 2008). Ésta enfermedad es causada por una combinación compleja entre factores ambientales y factores genéticos, entre los factores ambientales de mayor importancia es la exposición a la radiación ultravioleta de origen solar (Green y Whiteman 2006) y entre los genéticos se incluyen antecedentes familiares de cáncer de piel (Hayward 2003) y rasgos fenotípicos como por ejemplo el fototipo cutáneo caracterizado por la presencia de pecas, color de ojos y pelo claros. Estos rasgos fenotípicos son algunas de las formas más evidentes de la diversidad humana, sin embargo los complejos mecanismos genéticos que subyacen a las diferencias en éstos rasgos sólo hasta ahora se comienza a entender. Es probable que un pequeño conjunto de genes contribuyan en mayor medida en la variación de estos rasgos fenotípicos observados en poblaciones humanas (Sturm 2001). El receptor de melanocortina-1 (MC1R) es una proteína de 317 aminoácidos, está localizado en el cromosoma 16q24.3, asociada a proteínas G y fue el primer gen al que se le atribuyó un papel importante en la determinación de la pigmentación de la piel en poblaciones caucásicas normales (Box *et al*, 1997). Éste gen es altamente polimórfico, cuyas variantes más estudiadas se ubican en los codones Val60Leu, Arg67Gln, Asp84Glu, Val92Met, Arg121His, Arg142His, Arg151Cys, Ile155Thr, Arg160Trp, Arg163Gln, Asp294His como resultado de mutaciones puntuales (Box 1997). Algunas variantes son más frecuentes en individuos de piel blanca, que poseen cabello rubio o rojo los cuales que se queman fácilmente cuando se exponen al sol, en comparación a sujetos con cabello de color negro (Jiménez *et al* 2001). El efecto sobre la función del receptor de las variantes Arg142His, Arg151Cys, Arg160Trp y Asp294His se manifiesta como pérdida de función del receptor (Schioth, *et al* 1999). La situación es menos clara para el polimorfismo Val60Leu, ya que algunos estudios lo relacionan con la pérdida parcial de la función del receptor y además no se ha encontrado una correlación entre la presencia de ésta variante en particular y el color de piel y cabello (Schioth, *et al* 1999). En cualquier caso, el gen MC1R parece ser un factor determinante del color del pelo y de la piel, cuya función se ha reportado deteriorada en individuos, de piel blanca o cabello rojo. Razón por

la cual, MC1R se ha descrito como un factor genético asociado con el riesgo aumentado para desarrollar cáncer de piel (Smith 1998, Palmer 2000, Bastiaens 20001, Box 2001, Jiménez *et al* 2001).

Por otro lado, defectos en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), ha sido asociado con la susceptibilidad a desarrollar cáncer de piel. El rol de la vía NER tiene que ver con reparar lesiones en el ADN, por lo que defectos en ésta vía pueden contribuir a la predisposición a desarrollar enfermedades malignas en individuos, que los portan (Han et al., 2004; Lovatt et al., 2005). Uno de los genes participantes en esta vía es XPD, el cual se localiza en el cromosoma 19q13.3 y codifica para una proteína que constituye una subunidad del factor de transcripción IIIH (TFIIH) esencial para el adecuado funcionamiento del mecanismo de reparación NER (Baccarelli et al. 2004). Aún no se ha comprendido en su totalidad, el efecto sobre la función de XPD, de las variantes polimórficas en la secuencia del gen, sin embargo las variantes Asp312Asn y Lys751Gln están asociadas con la disminución en la capacidad de reparación y con el aumento de la susceptibilidad al cáncer (Goode 2002, Benhamou & Sarasin 2002, Chunxiang *et al* 2010)

En éste estudio pareado de casos y controles se determino las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos Arg151Cys del gen MC1R y Lys751Gln del gen XPD en una población colombiana se evaluó la asociación entre los polimorfismos mencionados y la presencia de melanoma maligno cutáneo y se determino si existe asociación entre los polimorfismos, con las características clinicopatológicas y el desarrollo de melanoma maligno cutáneo. Para investigar las frecuencias alélicas y genotípicas se utilizó la técnica de PCR y RFLPs en los 92 casos y en los 92 controles estudiados. Los controles se aparearon a los casos teniendo en cuenta sexo, edad, nivel socioeconómico, actividad laboral, procedencia y características fenotípicas.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La incidencia de melanoma maligno cutáneo (MMC) ha incrementado rápidamente en los últimos años. En el mundo se presentan aproximadamente 160 mil nuevos casos de melanoma al

año, y en algunos países se le ha dado una connotación de problema de salud pública (Parkin, et al 2005). En el año 2007, en Colombia fueron registrados 895 casos nuevos de cáncer de piel, situándolo como el tipo de cáncer más frecuente a nivel nacional, seguido por cáncer de cuello uterino (INC 2007). De los casos de cáncer de piel, 97 casos fueron de melanoma maligno cutáneo, ocupando el tercer lugar en frecuencia después del carcinoma de células basales (481 casos) y el carcinoma de células escamosas (134 casos) (INC 2007). Sin embargo, las dos últimas neoplasias aunque son las más comunes, presentaron una mortalidad muy baja y rara vez hicieron metástasis, contrario a lo que sucedió en melanoma maligno cutáneo donde la mortalidad y el potencial metastático fueron altos (INC. 2006).

El MMC se origina a partir de la transformación de los melanocitos, en células cancerosas, estos son un tipo de células pigmentadas ubicadas principalmente en la capa epidérmica de la piel (Gilchrest et al. 1999); como todo tipo de cáncer, el MMC es una enfermedad multifactorial en la que intervienen factores genéticos y ambientales en su desarrollo (Bressac-de-Paillerets et al. 2002). En 1956 se publicó el primer estudio que sugería una relación entre exposición solar y melanoma, la cual fue posteriormente corroborada por la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC), quienes reportaron que la radiación solar es carcinogénica y favorece el desarrollo de MMC (IARC. 1992), a tal punto que se sugirió que más del 65% de los melanomas podrían estar relacionados con exposición solar intensa intermitente, particularmente durante la infancia (Armstrong & Krickler, 1993).

El tipo de radiación más citotóxica y mutagénica de la luz es la luz Ultravioleta B (UVB) (Jhappan, et al. 2003; Ichihashi, et al. 2003). Los rayos UVB inducen principalmente la formación de fotoproductos diméricos entre pirimidinas adyacentes en la misma hebra de ADN, alteraciones conocidas como dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y 6-4 fotoproductos (6-4 pp) (Clingen, et al. 1995; Ichihashi, et al. 2003). Al no ser reparadas eficientemente, estas alteraciones pueden dar origen a mutaciones que se van acumulando y pueden dar origen a alteraciones de la función de genes claves en la supresión del crecimiento tumoral y por ende promover el desarrollo de lesiones cancerosas (Pavey, et al 1999; Honda, et al. 1999).

Reparar adecuadamente los daños en el ADN es un factor crítico para mantener la integridad del genoma y el control de diferentes opciones celulares: apoptosis, diferenciación y ciclo celular en células normalmente expuestas a radiación UV, como es el caso de los melanocitos (Pavey, et al 1999; Honda, et al. 1999). Uno de los mecanismos de reparación del ADN en células humanas, para restablecer la integridad del ADN cuando ha sido lesionado por radiación UV es la reparación por escisión de nucleótidos (NER, Nucleotide Excision Repair) (Hoeijmakers, J. et al 2001). La importancia de NER en la prevención de cáncer ocasionado por UV, fue evidenciada en individuos con defectos en genes cuya función tiene que ver con este mecanismo de reparación (familia génica XP); quienes presentaron baja capacidad de reparación de lesiones en el ADN inducidas por UV y un riesgo extremadamente alto de desarrollar cáncer de piel; entre ellos MMC (Sijbers, et al. 1996; Berneburg & Lehmann 2001; Ichihashi, et al. 2003). Los individuos sanos pueden presentar variantes polimórficas en los genes de reparación del ADN que pueden estar asociadas con capacidad de reparación disminuida y traducirse en inestabilidad genética la cual aumenta la susceptibilidad a desarrollar cáncer (Benhamou & Sarasin 2002); explicada por la posible acumulación de daños sin reparar en el genoma (Berwick & Vineis 2000; Cornetta et al. 2006).

La luz UVB es también un regulador de la expresión génica ya que la exposición a la misma induce el aumento en los niveles séricos de la hormona estimulante de melanocitos- $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH) (Gibbs, et al. 2002). La  $\alpha$ -MSH genera una respuesta celular, cuando se une al receptor de melanocortina-1 (MC1R) en los melanocitos, activa al factor de transcripción asociado a Microphthalmia (MITF) el cual a su vez aumenta la expresión del gen que codifica para la tirosinasa y otras enzimas responsables de la producción de melaninas (Levi, et al. 2006). Ha sido demostrado que el tipo de piel con pigmentación eumelanogénica (negra/marrón) es más resistente a los daños inducidos por la luz solar; sin esta la radiación UV estimularía más fácil la transformación neoplásica por daño directo en el ADN (Eves, et al. 2005). El gen MCR1 tiene una importante función en este proceso de pigmentación, codifica para el receptor de la hormona  $\alpha$ -MSH. Cuando la hormona se une al receptor, este se activa y activa a su vez la cascada de eventos celulares que conducen a la síntesis de las dos formas de melanina: eumelanina y feomelanina. Varios autores han reportado una posible asociación entre variantes alélicas del receptor MC1R (el cual es altamente polimórfico), y el riesgo aumentado a desarrollar MMC con

posible asociación también al fenotipo de pigmentación, particularmente se ha asociado una mayor sensibilidad a desarrollar la enfermedad en individuos que poseen piel clara. (Valverde, et al. 1995; Box, et al. 1997; Palmer, et al. 2000, Mossner, et al. 2007, Schioth, et al. 1999; Healy, et al. 2001; Bressac-de-Paillerets et al. 2002; Mossner, et al. 2007). Sin embargo, otros estudios reportan que algunos de los polimorfismos del gen MC1R aumentan el riesgo a desarrollar MMC de manera independiente del fenotipo de pigmentación (Kennedy, et al. 2001; Matichard, et al. 2004; Palmer, et al. 2000).

Dado que el incremento en la incidencia de MMC también se relaciona con la exposición aumentada a UV, es probable que polimorfismos de genes que participan en reparación de daño al ADN ocasionado por UVB o que regulan procesos de pigmentación, sean factores genéticos que contribuyan a aumentar o disminuir la susceptibilidad a desarrollar MMC. Por lo tanto analizar polimorfismos en el gen MC1R (involucrado en procesos de pigmentación de la piel) y en los genes de la familia XP (involucrado en procesos de reparación del ADN), permitirá establecer si existe relación con el riesgo aumentado a desarrollar MMC en un grupo de individuos colombianos.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Melanoma Maligno**

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, células productoras del pigmento melanina que derivan de la cresta neural durante el desarrollo embrionario (Liu and Herlyn 2005; Shen et al. 2000). Se presenta principalmente en adultos y el 50% de los casos surgen en áreas de la piel aparentemente normales (Liu and Herlyn 2005; Shen et al. 2000). La clasificación clínica de esta enfermedad se basa en la diseminación del tumor hacia los ganglios linfáticos o sitios distantes del sitio inicial donde ha ocurrido la lesión. Cualquier órgano puede verse afectado, sin embargo los pulmones y el hígado son los que con mayor frecuencia presentan melanoma maligno (Liu and Herlyn 2005; Shen et al. 2000).

Se ha demostrado que la exposición ocasional al sol, especialmente a una edad temprana y cuando se han ocasionado quemaduras severas, aumenta el riesgo a desarrollar este tipo de

cáncer. Otros factores que aumentan el riesgo para el desarrollo de esta enfermedad son: los rasgos fenotípicos (complexión pálida, ojos azules, cabello rubio/pelirrojo), nevus melanocíticos y quemaduras con ampollas por tomar el sol antes de los 20 años de edad (Ceballos, P. et al 1995). Así mismo la predisposición genética es otro factor de riesgo ya que un individuo con una historia familiar de melanoma tiene una probabilidad entre 10 y 12 veces mayor de desarrollar la enfermedad.

### **3.2 Receptor de Melanocortina 1 (MC1R)**

El receptor de la melanocortina 1 forma parte de un grupo de proteínas que constituyen el sistema de melanocortinas, este sistema está integrado por hormonas peptídicas estimulantes de melanocitos  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y la hormona adrenocorticotrópica; cinco receptores de melanocortinas con siete dominios transmembrana y asociados a proteínas G; y los antagonistas endógenos de melanocortina agouti y proteína relacionada a agouti (AGRP). Las melanocortinas son el resultado del procesamiento post-traducciona l de la prohormona proopiomelanocortina (POMC), y comparten la secuencia de aminoácidos His-Phe-Arg-Trp (Pritchard et al. 2002). Los receptores de melanocortinas (MCRs) generan una señal intracelular en respuesta a la hormona estimulante de melanocitos alfa ( $MSH\alpha$ ) que activa mediante un mecanismo dependiente de proteína G al efector adenilato ciclasa, el cual se activa a su vez y produce AMPc cuya concentración intracelular aumenta. MC1R es el receptor melanocítico clásico de  $MSH\alpha$  por su alta afinidad para interactuar con la hormona, este receptor está presente en melanocitos cutáneos y es una proteína importante para el proceso de pigmentación de la piel y el pelo (Gantz y Fong 2003; Nakayama et al. 2007).

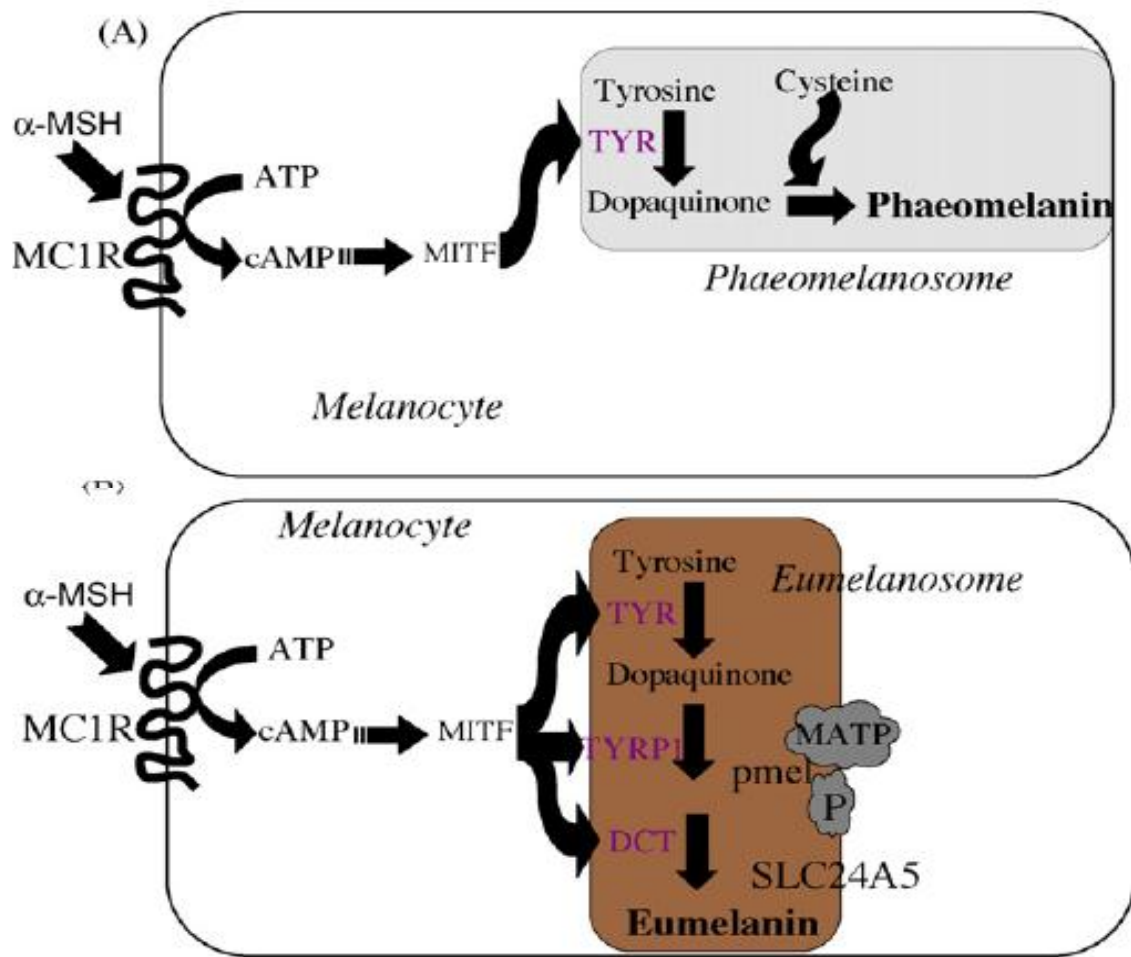
El gen que codifica para el receptor MC1R se localiza en la terminación telomérica del cromosoma 16q24.3 (Galore et al. 2007, Mössner et al. 2007), contiene un solo exón de 954 bp y codifica para una proteína de 317 aminoácidos que regula la cantidad y el tipo de pigmentos de melanina a producir. Hay dos tipos de pigmento de melanina: la eumelanina negro/café (fotoprotectora) y la feomelanina roja, que son sintetizadas por las células melanocíticas epidérmicas.

La unidad epidérmica melánica es un sistema funcional y estructural compuesto por células especializadas dendríticas productoras de pigmento, los melanocitos, los cuales están asociados a un grupo de queratinocitos que contienen partículas de pigmento denominadas melanosomas por el melanocito. Este proceso de secreción aparentemente único en biología en el cual una célula secreta en otra célula es llamado citocrina. En el pelo y la piel de los humanos la coloración no está determinada por el número de melanocitos sino por el número y distribución de los melanosomas y por su contenido en melanina. El color de la piel está asociado con el número de estos melanosomas presentes en los queratinocitos. El nivel de pigmentación melánica en humanos está determinado por tres factores: genético, exposición solar y por las hormonas pituitarias (hormona estimulante de los melanocitos (MSH) o (ACTH) (Quevedo et al, en:Fitzpatrick et al. 1987).

### **3.3 Melanogénesis**

La hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  (MSH $\alpha$ ) es producida por queratinocitos y cuando se une el receptor MC1R, induce el incremento de los niveles intracelulares de AMPc, el cual a su vez fosforila la proteína (CREB) de unión al elemento de respuesta a AMPc (CRE) presente en el promotor de algunos genes. La proteína CREB induce la expresión del gen que codifica para el factor de transcripción asociado a microphthalmia (MITF). MITF, a su vez activa la transcripción del gen de la tirosinasa (TYR), cuya proteína hidroliza a la tirosina produciendo dopaquinona, la cual es modificada por adición de una cisteína y por hidrólisis para finalmente producir el pigmento feomelanina. La feomelanina se produce de manera basal con niveles bajos de AMPc intracelular. Cuando estos se incrementan hay una mayor activación de MITF, quien no solo induce la transcripción del gen que codifica para la tirosinasa sino también de otros genes, como por ejemplo los que codifican para la proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TYRP1) y el dopacromo tautomerasa (DCT), esta última cataliza la isomerización de dopacromo a DHICA, la enzima DHICA oxidasa, oxida a su vez DHICA y genera eumelanina fotoprotectora. La producción de eumelanina esta favorecida por la ausencia de componentes tiólicos (Sturm et al. 1998, Matichard et al. 2004, Tully 2007. Ver Figura 1).





**FIGURA 1:** Esquema de la melanogénesis. (A) Unión de la hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  ( $\text{MSH}\alpha$ ) a su receptor (MC1R), lo que provocó un incremento de los niveles intracelulares de AMPc y la activación del factor de transcripción de microftalmia (MITF), que a su vez activa la transcripción de la tirosinasa (TYR) que inicia la síntesis de feomelanina. Si los niveles de AMPc son limitados, ésta forma de melanina es favorecida. (B) también MITF estimula la síntesis de la proteína TYRP1 y DCT, que en condiciones adecuadas, producen eumelanina. *Tully G. Genotype vs phenotype: Human pigmentation. Forensic Science International: Genetics 1, 2007, 105–110*

La síntesis y polimerización de los precursores de melanina al interior de la célula se lleva a cabo en los melanosomas, los cuales están especializados en producir un tipo de melanina en particular: los eumelanosomas producen eumelanina y los feomelanosomas producen feomelanina. El proceso de maduración de los melanosomas tiene 4 estadios: en el estadio I el

melanosoma es una vacuola esférica derivada del retículo endoplasmático que no presenta depósito de melanina; en el estadio II presenta forma ovalada, con una matriz evidente en forma de filamentos paralelos longitudinales y con un mínimo depósito de melanina y con actividad tirosinasa elevada; en el estadio III los melanosomas ovalados presentan un depósito moderado de melanina y actividad elevada de tirosinasa y en el estadio IV el depósito de melanina es denso y la actividad de tirosinasa es mínima. Sin embargo, en el caso de los eumelanosomas, estos permanecen esféricos durante todo el proceso de maduración (Sturm et al. 1998; Rigel et al. 2006). Para la formación y maduración de los melanosomas, las proteínas Pmel17, MATP, P y SLC24A5 son necesarias (Du et al 2003; Valencia et al. 2006).

La producción de nueva melanina está relacionada con la capacidad de bronceo de la piel, de igual manera el balance entre eumelanina y feomelanina. La eumelanina es fotoprotectora y la feomelanina facilita la generación de radicales libres luego de exposición a UV, lo cual aumenta el riesgo a desarrollar cáncer. La proporción relativa de la concentración de eumelanina y feomelanina en los mamíferos está regulada por el receptor de la hormona estimulante de melanocitos (MC1R) (Suzuki et al, 1999; Koppula et al. 1997; Ichii-Jones et al. 1998). Una exposición prolongada de la piel a radiación UV en un tiempo de días y semanas lleva a cambios adaptativos de la piel, disminuyendo la respuesta inflamatoria. Esto se debe a que se aumenta la cantidad de melanina, la cual ejerce alguna protección contra la radiación futura a UV (Eller et al. 1996; Gilchrest et al. 1999). En ausencia de melanina la epidermis se engrosa para proteger las estructuras internas a futuras exposiciones de la piel. Sin embargo, estos procesos que se ejercen como actividades que intentan bloquear los efectos del sol y el estímulo que lleva a la adaptación de la piel ya están asociados con un daño celular inicial y se ha demostrado que el bronceo es una respuesta al daño en el ADN (Eller et al. 1996; Gilchrest et al. 1999).

La exposición intermitente no da tiempo suficiente a los melanocitos de sintetizar la melanina para proteger el núcleo celular de los efectos de la radiación UV, por lo tanto conlleva más rápidamente a la fijación de mutaciones en el ADN como resultado de la reparación incorrecta o no reparación de lesiones sobre el genoma (Perlis y Merlyn 2004).

### **3.4 Radiación Solar UV**

En estudios de tipo epidemiológicos (Nelemans et al. 1993; Bentham y Aase 1996; Osterlind et al. 1988; Preston y Stern 1992), se ha reportado una fuerte asociación entre la formación de melanoma y exposición aumentada a luz solar. De los diferentes tipos de cáncer de piel los carcinomas de células escamosas y de células basales parecen estar asociados con una exposición solar continua en el tiempo durante la vida de los individuos, mientras que el melanoma cutáneo maligno lo está más con una exposición intensa e intermitente, medida por la historia de quemaduras en la piel producidas por la exposición al sol.

La luz ultravioleta se compone de tres longitudes de onda diferentes: UVA en el rango de 320 a 400 nm, UVB de 280 a 320 nm y UVC de 200 a 280 nm. Toda la radiación solar UVC y una gran parte de UVB son efectivamente filtradas por la capa de ozono de la tierra, con lo cual la composición de luz solar UV incidente sobre la superficie de la tierra es de 95% UVA y 5% UVB (Ibrahim et al. 2008). El rango del espectro UV de 280-400 nm es el responsable de la mayoría de los efectos dañinos sobre la piel, la radiación solar UVB es carcinógena, debido a que su energía es directamente absorbida por el ADN induciendo apareamiento erróneo de las bases nitrogenadas (Diffey 1999; Ibrahim et al. 2008). Estos daños generalmente son reparados por sistemas celulares especializados, cuando estos se encuentran alterados o los daños desbordan su capacidad de reparación se pueden acumular y transmitir alteraciones del genoma a otras generaciones celulares favoreciendo la fijación de mutaciones (Carty et al. 1993).

### **3.5 Vía de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)**

La vía de reparación NER se activa con la detección de daños en el ADN inducidos por radiación UV, que han generando lesiones voluminosas como por ejemplo formación de dímeros de ciclobutano-pirimidina formados entre timinas o citocinas adyacentes ó fotoproductos pirimidina-pirimidona y carbohidratos aromáticos policíclicos (Jhappan et al. 2003; Thoms et al. 2007). Estos daños son reparados de forma efectiva por la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) que involucra al menos 20 genes. El sistema repara una variedad de lesiones que afectan

una sola cadena y que interfieren con el apareamiento de bases que generalmente bloquean los mecanismos de transcripción y replicación normales. Se divide en dos sub- vías con distinción parcial específica del sustrato: NER de genoma global (GG-NER) que inspecciona todo el genoma para reparar el daño, y la reparación acoplada a la transcripción (TCR) que se centra en el daño que bloquea la elongación de la RNA polimerasa (Hoeijmakers 2001).

El complejo específico de GG-NER, XPC-hHR23B reconoce errores de complementariedad de bases sobre la cadena de ADN. Para permitir el acceso a la lesión la RNA polimerasa es desplazada por los factores CSB y CSA, siendo este un paso crítico durante la reparación. Las helicasas XPB y XPD del complejo de transcripción TFIIH separan 30 pares de bases de ADN alrededor de la lesión. XPA actúa como sensor de conformaciones defectuosas en el apareamiento de bases, y la proteína de unión a cadena sencilla RPA (Proteína de replicación A) estabiliza la abertura uniéndose a la cadena no dañada. Las endonucleasas XPG y ERCC1/XPF cortan los extremos 3' y 5', respectivamente, del segmento abierto pero únicamente actúan sobre la cadena dañada generando un oligonucleótido de 27-29 bp que contiene la lesión. La maquinaria de replicación de ADN, formada por polimerasas y ligasas, completa y termina la reparación sintetizando la cadena complementaria a partir de la hebra intacta que actúa como molde (Buschta-Hedayat 1999; Hoeijmakers 2001; Thoms et al. 2007). En total son siete los grupos de genes (XPA-XPG) que están involucrados en la vía de reparación NER (Emmert et al. 2000).

El gen XPD se localiza en el cromosoma 19q13.3, el gen XPC en el cromosoma 3p25 y el gen ERCC1 en el cromosoma 19q13.2-13.3. La proteína XPD es una subunidad del factor de transcripción IIH (TFIIH) y esta involucrada en la separación de la doble cadena de DNA durante la reparación de la misma y en el inicio de la transcripción basal (Baccarelli et al. 2004). Los polimorfismos Asp312Asn y Lys751Gln alteran la estructura secundaria afectando su configuración tridimensional y estabilidad (Wolfe et al. 2007).

Los hallazgos moleculares descritos para el albinismo y la enfermedad Xeroderma pigmentosum han sido modelos útiles para entender el funcionamiento de los mecanismos moleculares que participan en la reparación del ADN, en respuesta a daños causados por la radiación solar UV,

además de facilitar la comprensión de la sensibilidad de la piel a los efectos de la misma radiación. El albinismo es un desorden mendeliano caracterizado por baja producción de melanina, los individuos con este desorden toleran menos la exposición solar a UV que individuos normales en iguales condiciones de exposición. Los albinos padecen más frecuentemente que la población general, algunas formas de cáncer de piel. De manera similar el Xeroderma pigmentosum (XP) es otro desorden mendeliano que se caracteriza por defectos en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) del ADN nuclear. Los individuos con este desorden son altamente sensibles al efecto dañino de la radiación UV que produce complicaciones similares a las del albinismo y a una alta incidencia de cáncer de piel antes de los 5 años de edad, entre ellos el melanoma maligno cutáneo (Hoeijmakers 2001; Bootsma et al. 2001). El XP es un síndrome prototipo de NER, por tener una relación directa entre la deficiencia del sistema de reparación NER y la asociación con el desarrollo de cáncer (Ishikawa et al. 2004). El mal funcionamiento de esta vía de reparación también se ha asociado con el Síndrome de Cockayne y el de Tricotiodistrofia (TTD), caracterizados por una alta sensibilidad a los efectos de la exposición solar. Se ha reportado que una reducción en la capacidad de reparación del ADN es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de melanoma cutáneo en la población general (Wei et al. 2003; Thoms et al. 2007).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes relacionados con la respuesta celular a la exposición solar: XPD, y MC1R en un grupo de pacientes colombianos con melanoma maligno cutáneo, y compararlas con las que presentan un grupo de individuos sin antecedentes de cáncer en Colombia.

## 4.2 Específico

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos: Arg151Cys del gen MC1R; y Lys751Gln del gen XPD.
- Determinar si existe asociación entre los polimorfismos de los genes a estudiar y la presencia de MMC.
- Determinar si existe asociación entre los polimorfismos de los genes a estudiar con las características clinicopatológicas y el desarrollo de MMC.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Tipo de Estudio

Se realizó un estudio analítico pareado de casos y controles (relación 1:1).

### 5.2 Población de Estudio

MUESTRAS	CRITERIOS DE INCLUSION
<b>GRUPO DE CASOS</b>	Pacientes con MMC (Diagnóstico confirmado tanto clínico como patológico).
	Voluntariamente firmaron consentimiento informado.
<b>GRUPO CONTROL</b>	Personas sin ningún tipo de cáncer
	Similaridad con grupo control: nivel socioeconómico, edad, género, actividad laboral, procedencia y características fenotípicas.

### 5.3 Procedimiento de Muestreo

Para estimar la posible asociación entre el genotipo (constituido por los polimorfismos Lys751Gln y Arg151Cys) y la presencia de melanoma cutáneo, se utilizó la prueba de McNemar obtenida por Machin, D., Campbell, M.J. Fayers P.M., y Pinol. A.P.Y., 1997; Lachin

J.M., 1992; para una confiabilidad del 95% y un poder del 80%, tomando la razón de ventaja (odds ratio) mínimo de 2, en consideración a estudios realizados previamente con estos genes en otras poblaciones (Kennedy et al. 2001; Matichard et al. 2004; Li et al. 2006) y un porcentaje de discordancia del 50%. El tamaño de muestra final para estudios pareados, un caso y un control fue 92:92 (ajustado por 10% de pérdidas). También se tuvo en cuenta la ecuación dada por el paquete EPIDAT para casos y controles pareados, mostrando concordancia al ajustar por la relación 1:1.

### **5.3.1 Recolección de la Información**

Cada participante en el estudio firmó un consentimiento informado una vez se le explicó el estudio y se le resolvieron las inquietudes, enseguida se le tomó una muestra de 10ml de sangre periférica, con el objetivo de obtener ADN para la realización de las pruebas. Además se obtuvo información acerca de los participantes, la cual fue consignada en una hoja de registro cuya información facilitará el análisis de los factores que pueden estar influyendo en los resultados del presente trabajo, como por ejemplo la exposición solar y el tipo de piel.

## **5.4 Técnicas y Procedimientos**

### **5.4.1 Extracción de ADN**

El ADN a partir de muestras de sangre total se obtuvo por medio del uso de la técnica PROBE (Briceño 1988), y de fase orgánica proveniente de muestras de sangre procesadas con trizol que habían sido utilizadas para extracción de ARN en otros estudios. Los donantes de estas últimas, aceptaron participar en otros estudios derivados de aquel en que participaron inicialmente.

Brevemente, en la técnica PROBE, a las muestras de sangre se les agregó buffer de lisis de glóbulos rojos, luego fueron centrifugadas a 3000 rpm y al pellet de glóbulos blancos recuperado se le adicionó buffer de lisis celular. Posteriormente se agregó solución precipitante de proteínas, alcohol isopropílico frío y etanol al 70%; finalmente el ADN aislado se resuspendió en buffer TE al 10% y se almacenó a -20°C.

Para extraer ADN a partir de fase orgánica, se le agregó a la interfase y al trizol 300 ul de isopropanol, se centrifugó a 2000 rpm y al pellet se le agregó 1 ml de 0.1 M de citrato de sodio en 10 % de etanol, se incubó durante 30 min y posteriormente se centrifugó nuevamente a 2000 rpm. Al pellet obtenido se le adicionó 1.5 ml de etanol al 75% y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, tiempo después del cual se centrifugó a 2000 rpm, en este punto se descartó el sobrenadante, se dejó evaporar el alcohol y se le agregó 400 ul de 8mM NaOH. El ADN al igual que en PROBE es almacenado a -20°C.

#### 5.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La región polimórfica a estudiar de cada uno de los genes XPD y MC1R se amplificó mediante PCR convencional. Las secuencias de los oligos o cebadores que se utilizaron se presentan en la tabla 1, con el tamaño esperado para cada fragmento amplificado.

Tabla 1. Secuencias de los oligos que se usaron como cebadores

<b>Polimorfismo</b>	<b>Sentido</b>	<b>Secuencia cebadores</b>	<b>Tamaño</b>
XPD Lys751Gln	Forw	5'-ATCCTGTCCCTACTGGCCATTC-3'	324 pb
	Rev	5'-TGTGGACGTGACAGTGAGAAAT-3'.	
MC1R Arg151Cys	Forw	5'-CAGCACCATGAACTAAGCAGGACACCTG-3'	238 pb
	Rev	5'-CCAGCATAGCCAGGAAGAAGACCACGAG-3'	

#### 5.4.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Los productos de PCR amplificados se sometieron a digestión enzimática para evidenciar la presencia o ausencia de los polimorfismos a estudiar, para Lys751Gln se usó la enzima PsT1 y para el Arg151Cys la enzima Hha1 (Ver Tabla 2).



Tabla 2. Tamaño de los fragmentos esperados después de la digestión enzimática.

Polimorfismo	Enzima	Genotipos	Tamaño fragmentos esperados
XPD Lys751Gln	Pst1	Lys/Lys	100pb - 224 pb
		Gln/Gln	158pb - 100pb - 66pb
		Lys/Gln	224pb - 158pb - 100pb - 66pb
MC1R Arg151Cys	Hha1	Arg/Arg	175pb - 43pb - 20pb
		Cys/Cys	175pb - 63pb
		Arg/Cys	175pb - 63pb - 43pb - 20pb

#### 5.4.4 Verificación en gel de Agarosa

Para visualizar los resultados, los productos amplificados después de haber sido sometido a digestión enzimática fueron corridos en geles de agarosa al 3%, durante 2 horas, a 110 volteos, teñido con Bromuro de Etidio, visualizados y fotografiados en un fotodocumentador.

## 6. RESULTADOS

Una vez extraído el ADN, se procedió a realizar las reacciones de PCR y la digestión con enzimas de restricción y los geles para las 92 muestras de ADN obtenidas a partir del grupo de los casos y las 92 muestras obtenidas del grupo control.

### 6.1 PCR

#### 6.1.1 MC1R

La mezcla de reacción final de PCR estandarizada contiene: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Primers 0.05 μM, 1U de Taq DNA polimerasa (*Bioline*), dNTPs 200 μM (*Promega*) y aproximadamente 100 ng de ADN en un volumen total de 25 μl. Las condiciones finales de reacción fueron: 94° por 4 min, 30 ciclos a 94° por 50 seg, 65° por 50 seg, 72° por 1 min y un paso de extensión final de 72° por 10 min. El fragmento obtenido fue de 238 pb (ver anexo 1, Figura 1).

### **6.1.2 XPD**

La mezcla de reacción final de PCR estandarizada contiene: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Primers 0.05 μM, 1U de Taq DNA polimerasa (*Bioline*), dNTPs 200 μM (*Promega*) y aproximadamente 100 ng de ADN en un volumen total de 25 μl. Las condiciones finales de reacción fueron: 96° por 2 min, 30 ciclos a 94° por 30 seg, 63° por 30 seg, 72° por 1 min y un paso de extensión final de 72° por 5 min. El fragmento obtenido fue de 324 pb (ver anexo 1, Figura 2).

## **6.2 RFLPs**

### **6.2.1 MCIR**

Para estudiar el polimorfismo Arg151Cys se utilizó la enzima Hha1. Las condiciones bajo las cuales se realizó la digestión enzimática fueron: 1X Buffer NE3 1,5 μl; BSA 0.15μL; Hha1 (4U)= 0.25 μl; Pr PCR 10 μl; H<sub>2</sub>O=3.1 μl. Todo en un volumen final de 15μl e incubado a 40°C por toda la noche

En los geles se evidenciaron tres bandas (175, 43 y 20 pb) para personas homocigotas sin el polimorfismo; dos bandas (175 y 63 pb) para personas homocigotas con el polimorfismo y 4 bandas (175, 63, 43 y 20 pb) para personas heterocigotas (ver anexo 1, Figura 3 y 4).

### **6.2.2 XPD**

Para estudiar el polimorfismo Lys751Gln se utilizó la enzima Pst1. Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la digestión enzimática fueron: 1X Buffer NE3 1,5 μl; Pst1 (4U)= 0.2 μl; Pr PCR 10 μl; H<sub>2</sub>O=3.3 μl. Todo en un volumen final de 15μl e incubado a 40°C por toda la noche.

Sobre los geles se observaron dos bandas (100 y 224 pb) para personas homocigotas sin el polimorfismo; tres bandas (158, 100 y 66 pb) para personas homocigotas con el polimorfismo y 4 bandas (224, 158, 100 y 66 pb) para personas heterocigotas (ver anexo 1, Figura 5 y 6).

## **6.3 Análisis Descriptivo**

El tipo de investigación realizada fue de carácter analítico pareado de casos y controles (relación 1:1), en donde la muestra de estudio tuvo un tamaño de 184 individuos, de los cuales 92 fueron casos y 92 controles.

### ***6.3.1 Casos***

De los 92 pacientes con melanoma maligno cutáneo 46% presentó color de piel blanca, seguido por 28 % de piel morena y 17 % con piel trigueña; 75% de los pacientes tuvieron ojos de color café, seguido por 8% de color verde y 7% de otro color; 43% de los pacientes tuvieron color de cabello negro, 32% color marrón oscuro y 13% color marrón claro. El 67 % de los pacientes nunca presentaron quemaduras severas por el sol, en tanto que el 30% sí. El 61% se exponía principalmente al sol por razones recreativas mientras que el 37% por razones laborales. De acuerdo a la clasificación de Fitzpatrick de 1988, el 36% de los pacientes tuvo tipo de piel III, seguido con un 29% de tipo I y un 14% tipo II y el 11% tipo IV.

### ***6.3.2 Controles***

De los 92 individuos control participantes, 49% presentó piel blanca, seguido por 29 % de piel morena y 16 % con piel trigueña; 76% tuvieron ojos de color café, seguido por 11% de color verde y 4% de otro color; 43% tuvieron cabello de color negro, 30% de color marrón oscuro y 13% de color marrón claro. El 77% nunca tuvo quemaduras severas por el sol mientras que el 17% sí. El 66% se expuso al sol principalmente por razones recreativas mientras que el 37% por razones laborales. El 36% presentó tipo de piel II, seguido con 25% de tipo de piel I, 17% tipo IV y 11% tipo III.

## **6.4 Análisis Bivariado**

### ***6.4.1 XPD***

La frecuencia genotípicas para el polimorfismo de Lys751Gln del gen XPD fue de 60 casos (65%) homocigotos para el alelo silvestre, 4 casos (4%) homocigotos para el alelo Gln y 28

casos (30%) heterocigotos. En los controles se obtuvo que 53 controles (58%) fueron homocigotos para el alelo silvestre, 4 controles (4%) homocigotos con el polimorfismo y 35 controles (38%) fueron heterocigotos. Las frecuencias alélicas para el alelo Lys en el grupo de casos fue 148 (80%) y en controles 141 (77%). Para el alelo Gln las frecuencias alélicas observadas en casos fue 36 (20%) y en controles 43 (23%) (Ver anexo 2, tabla 1).

A partir de las frecuencias alélicas se obtuvo los valores esperados (Ver anexo 2, Tabla 1) y a partir de éstos se aplicó la prueba de Ji cuadrado para determinar si las poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. De acuerdo a la regla de decisión de Ji cuadrado, cuando Ji cuadrado calculada es mayor a Ji cuadrado tabulado se rechaza Ho. De igual forma, si Ji cuadrado calculada es menor a Ji cuadrado tabulado se acepta el Ho, donde la hipótesis nula (Ho) dice que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg y la hipótesis alterna (H<sub>A</sub>) dice que la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El valor obtenido en la prueba de Ji cuadrado fue 0.05 para el grupo de los casos y de 0.3 para el de los controles. Tanto para casos y controles del polimorfismo XPD el valor de Ji- cuadrado tabulado fue 3.84. Por lo tanto, la decisión estadística para XPD es aceptar la Ho, es decir, la población muestreada sí está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se realizó un análisis de frecuencias para las características clínico-patológicas que son variables cualitativas entre los grupos. Los análisis de frecuencias utilizando la prueba de Ji cuadrado ( $X^2$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) entre los grupos (casos y controles) cuando se evaluaron las siguientes características: color de piel, color de ojos, color de cabello, circunstancias por las que se expone al sol y tipo de piel, indicando que no hubo sesgos en el muestreo al considerarse la opción de realizar un estudio analítico pareado de casos y controles (ver anexo 2, tabla 3).

El análisis de las características clínico-patológicas y el polimorfismo Lys751Gln se evaluó mediante la prueba de Ji cuadrado ( $X^2$ ) arrojando diferencias estadísticamente significativas entre el genotipo Lys/Lys y la variable color de ojos ( $P=0.007$ ) (Ver anexo 2, tabla 4); para el resto de análisis de la relación entre los polimorfismos y las características por las que se parearon, como por ejemplo: color piel, color de ojos, color cabello, circunstancias por las que se expone al sol,

quemaduras severas por el sol, tipo de piel y tipo de melanoma no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ). El color de piel no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.72$ ). El color de ojos no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.44$ ). El color de cabello no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.81$ ). Las circunstancias por las que los individuos participantes se expusieron al sol no estuvieron en relación con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.8$ ). Antecedentes de quemaduras severas causadas por el sol tampoco se encontraron relacionadas con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.63$ ). El tipo de piel no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.63$ ) (ver anexo 2, tabla 4).

#### **6.4.2 MC1R**

Para MC1R se observó que 84 casos (91%) fueron homocigotos silvestre, 0 casos fueron homocigotos Cys y 8 casos (9%) fueron heterocigotos. En el grupo control se observó que 88 individuos (96%) fueron homocigotos silvestre, 1 individuo (1%) fue homocigoto Cys y 3 individuos (3%) fueron heterocigotos. Las frecuencias alélicas para Arg observadas en casos fue de 176 (96%) y en controles de 179 (97%). Para el alelo Cys las frecuencias alélicas obtenidas fueron: 8 individuos del grupo de casos (4%) y 5 en el grupo de controles (3%) (Ver anexo 2, tabla 2).

A partir de las frecuencias alélicas se obtuvieron los valores esperados y a partir de éstos se aplicó la prueba de Ji cuadrado para determinar si las poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. De acuerdo a la regla de decisión de Ji cuadrado, cuando Ji cuadrado calculada es mayor a Ji cuadrado tabulado se rechaza la  $H_0$ . De igual forma, si Ji cuadrado calculada es menor a  $X^2$  tabulado se acepta el  $H_0$ , donde la hipótesis nula ( $H_0$ ) dice que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg y la hipótesis alterna ( $H_A$ ) dice que la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los valores obtenidos en la prueba de Ji cuadrado para el grupo de los casos fue de 1.15 y para el de los controles fue de 0.8. Tanto para el grupo de individuos casos y como para el de controles

evaluados para el polimorfismo MC1R Ji cuadrado tabulado fue de 3.84, lo que muestra que se acepta la Ho.

El análisis de las características clínico-patológicas, se hizo considerando que son variables cualitativas entre los grupos, por lo que se tuvo en cuenta la frecuencia de aparición de las mismas. Se aplicó una prueba de Ji cuadrado ( $X^2$ ) cuyo valor obtenido fue para color de piel  $P=0.986$ , color de ojos  $P=0.678$ , color cabello  $P=0.921$ , tipo de piel  $P=0.636$  y para antecedentes de cáncer  $P=0.189$ , lo que indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (casos y controles) y las características por las que se aparearon (color de piel, color de ojos, color de cabello, antecedentes con cáncer y tipo de piel) indicando que no hubo sesgos en el muestreo y/o recolección de las muestras por la naturaleza del estudio que plantea la comparación entre un grupo de casos y otro de controles (ver anexo 2, tabla 3).

El análisis de evaluación entre características clínico-patológicas y el polimorfismo Arg151Cys, se evaluó mediante la prueba de Ji cuadrado. Los análisis de frecuencias utilizando la prueba de Ji cuadrado ( $X^2$ ) indicaron que hay diferencias estadísticamente significativas entre el genotipo Arg/Arg y la variable antecedentes de quemaduras severas por el sol ( $P=0.058$ ) (Ver anexo 2, tabla 4); para el resto de análisis no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre el polimorfismo y las características por las que se aparearon (color piel, color de ojos, color cabello, circunstancias por la que se expone al sol y tipo de piel). El color de piel no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.936$ ). El color de ojos no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.98$ ). El color de cabello no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.688$ ). Las circunstancias por las que se exponen al sol no se relacionaron con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.477$ ). Antecedentes de quemaduras severas causadas por el sol no se relacionaron con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.1$ ). El tipo de piel no se relacionó con la presencia de melanoma maligno cutáneo ( $P=0.294$ ) (ver anexo 2, tabla 4).

## **6.5 Análisis Multivariado**

### **6.5.1 XPD**

Para determinar asociación entre el polimorfismo Lys751Gln y la presencia de MMC se realizó una regresión logística.

Los análisis mostraron que no existe asociación entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de MMC. Los resultados no fueron estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ) para el genotipo Gln/Gln ( $P = 0.865$ ; IC95% = 0,270 – 4,75) y Lys/Gln ( $P = 0.272$ ; IC95% = 0,762 – 2,629) (Ver anexo 2, tabla 5).

### **6.5.2 MC1R**

Para determinar asociación entre el polimorfismo Arg151Cys y la presencia de MMC se realizó una regresión logística.

Los análisis mostraron que no existe asociación entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de MMC. Los resultados no fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) para el genotipo Cys/Cys ( $P = 1$ ; IC95% = 0,0 – 1) y Arg/Cys ( $P = 0.139$ ; IC95% = 0,92 – 1,395) (Ver anexo 2, tabla 6).

## **7. DISCUSIÓN**

Los polimorfismos evaluados en este estudio ya han sido asociados con cáncer de piel y en algunas ocasiones con otros tipos de cáncer en otras poblaciones, principalmente caucásicas (Box *et al*, 1997, Jiménez *et al* 2001). En el presente estudio no se observó asociación entre la presencia de los polimorfismos Lys751Gln y Arg151Cys y el desarrollo de MMC, lo cual no es consistente con estudios realizados por Van der Velden *et al* (2001) en familias holandesas con antecedentes de melanoma, donde encontraron que el polimorfismo Arg151Cys incrementa el riesgo a desarrollar melanoma (OR=1.8). Posteriormente, evaluaron la correlación entre la presencia del polimorfismo Arg151Cys y el riesgo a desarrollar melanoma en personas de piel blanca y encontraron una diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.05$ ). El polimorfismo

Arg151Cys en estudios de Healy *et al* en el año 2000 fue particularmente asociado con el color de piel blanca, además el alelo Cys específicamente en el genotipo resultó ser suficiente para causar piel blanca y el riesgo de melanoma maligno cutáneo, diferente a lo que se halló en el presente estudio, pues no se encontró una correlación entre el polimorfismo, el riesgo a desarrollar melanoma y el color de piel. Estas diferencias encontradas entre los estudios pueden ser por la población de estudio, el tamaño de muestra o los criterios de inclusión utilizados en cada trabajo. Por ejemplo Van der Velden *et al* (2001) estudio una población Holandesa, formada por 128 controles y 59 individuos que incluye pacientes con melanoma maligno e individuos con antecedentes de melanoma en la familia. Healy *et al* (2000) estudio una población irlandesa, formada por 460 individuos que constantemente estaban expuestos al sol durante su vida y no tenían cabello rojo y 399 individuos con todo tipo de color de cabello y que durante su vida no hayan estado muy expuestos al sol.

Igualmente, Kennedy y colaboradores en el año 2001 observaron en una población caucásica que la variante alélica Cys del gen MC1R es un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma maligno independiente al color de piel, hecho que no fue observado en el presente estudio. Sin embargo, en el estudio realizado por Kennedy y colaboradores observaron que los individuos que presentaron tipo de piel I y II tuvieron un riesgo relativo para melanoma (OR=2.7; IC95%= 1.7-4.2) comparado con el tipo de piel III y IV, diferente a lo que se observó en el presente estudio donde no se halló un riesgo asociado para el desarrollo de melanoma y el tipo de piel (de acuerdo a la clasificación de Fitzpatrick, 1988).

Igualmente reportes de estudios realizados en población europea muestran asociación entre el polimorfismo Arg151Cys y el riesgo a desarrollar cáncer de piel (OR 2.2 IC95% 1.1-4.2) (Duffy *et al* 2003), diferente a lo que se observó en el presente estudio. El estudio de Duffy *et al* (2003) fue en una población europea formada por gemelos adolescentes y sus hermanos, de los cuales 1790 fueron mujeres y 1656 fueron hombres, donde evaluaron las variantes alélicas del gen MC1R, características fenotípicas asociadas con las variantes del gen MC1R (cabello rojo, piel blanca, nevus atípicos) y el riesgo aumentado a desarrollar melanoma. Los gemelos fueron examinados en tres ocasiones, a los 12, 14 y 16 años. Dichos datos indican que el no encontrar asociación significativa en el presente estudio del polimorfismo Arg151Cys con riesgo



aumentado a desarrollar cáncer de piel, pueda deberse a la necesidad de aumentar el tamaño de muestra a analizar, o probablemente sea consecuencia de las diferencias entre los dos estudios, por ejemplo el tipo de población estudiada y la forma en que se tomaron los datos.

Investigaciones realizadas sobre el gen MC1R no solo han mostrado la importancia de éste gen en la pigmentación del cabello y la piel, también ha mostrado tener un rol importante en procesos de inmunidad (Bataille, 2003). López *et al* en el año 2007 demostraron que tres péptidos derivados del gen MC1R puede inducir la expansión de péptidos específicos de Linfocitos T citotóxicos (CTLs) a partir de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos. Basados en éstos estudios, López *et al* en el mismo año concluyeron que se podría considerar a MC1R un objetivo inmunológico en los seres humanos, lo que da lugar a la posibilidad de la inmunoterapia antígeno-específica, basado en células T específicas de MC1R ó la vacunación con células presentadoras de antígeno cargadas con péptidos derivados de MC1R, las cuales pueden constituir una alternativa válida para el tratamiento de melanoma ya que ha sido demostrado con otros antígenos relacionados con melanoma. Por otro lado, el éxito potencial de la inmunoterapia basada en anticuerpos dirigidos por MC1R dependería de la expresión del gen en la superficie celular de células de melanoma en comparación con los tejidos sanos (López *et al* 2007). López *et al* 2007 demostraron en estudios previos que MC1R se expresa en grandes cantidades a nivel intracelular, además la expresión en la superficie celular del gen MC1R en células de melanoma puede ser inducida en células inmunocompetentes como los monocitos y macrófagos por citoquinas, por esta razón se puede considerar a MC1R como un marcador altamente específico.

El cuanto a los análisis realizados para características clinicopatológicas vs el polimorfismo Arg151Cys del gen MC1R usando la prueba de Ji-cuadrado se obtuvo valores estadísticamente significativos entre la variable antecedentes de quemaduras severas por el sol y el genotipo homocigoto Arg/Arg del gen MC1R ( $P=0.058$ ), indicando que ese genotipo en particular está asociado con la susceptibilidad a las quemaduras causadas por el sol.

En cuanto al gen XPD, Chunxiang Li y colaboradores en el 2009 y Tomescu y colaboradores en el 2001, observaron que en la población asiática la presencia del polimorfismo Lys751Gln del gen XPD genera un mayor riesgo a desarrollar cáncer ( $P = 0.04$ , OR = 1.12, 95% CI (1.01, 1.25),

diferente a lo que se observó en el estudio realizado por Dufloth y colaboradores en el 2005 en una población en Brasil donde encontraron que tener el polimorfismo Lys751Gln no genera un aumento en la susceptibilidad al cáncer, lo cual es consistente con lo observado en el presente estudio.

En cuanto a los análisis realizados para casos vs el polimorfismo Lys751Gln del gen XPD, se obtuvo valores estadísticamente significativos en la prueba de Ji-cuadrado para la variable color de ojos y el genotipo homocigoto Lys751 (P=0.007), indicando que el color de ojos está asociado con la presencia de ese genotipo en particular dentro de nuestra población de estudio.

## **8. CONCLUSIÓN**

No se encontró asociación entre la presencia de los polimorfismo Lys751Gln del gen XPD y el desarrollo de melanoma maligno cutáneo.

Igualmente, no se encontró asociación entre el polimorfismo Arg151Cys del gen MC1R y el desarrollo de melanoma maligno cutáneo.

Se pudo establecer asociación entre la variable antecedentes de quemaduras severas causadas por el sol y el genotipo Arg/Arg, pero no se pudo hallar asociación entre la variable, el genotipo y el riesgo a desarrollar melanoma.

Se pudo establecer asociación entre la variable color de ojos y el genotipo Lys/Lys, pero no se pudo hallar asociación entre la variable, el genotipo y el riesgo a desarrollar melanoma.

Se concluye que estudios con un mayor número de casos, en donde se incluyan poblaciones representativas de todo el país podrían dar información más amplia acerca de los polimorfismos estudiados y su asociación con el melanoma Maligno.

## **9. RECOMENDACIONES**

Evaluar nuevos polimorfismos asociados con melanoma maligno cutáneo.

Evaluar una población más grande en donde se encuentren individuos de todas las regiones del país.

Realizar estudios de los mismos polimorfismos, pero en otros modelos tumorales para hayas posibles asociaciones.

Generar polticas que favorezcan la investigación en nuestro país, para poder acceder a la información de lo que ya se tiene, y así mismo tener los medios necesarios para producir la información que no se tiene.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Armstrong B.K.; A. Kricger. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 1993; 3(6):395-401.

Benhamou S. and A. Sarasin. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis* 2002; 17:463-469.

Berneburg M. and A.R. Lehmann. Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and trascription. *Adv Genet* 2001; 43:71-102.

Berwick M. and A. Halpern. Melanoma epidemiology. *Curr Opin Oncol* 1997; 9:178-182.

Berwick M. and P. Vineis. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J. Natl Cancer Inst.* 2000; 92:874–897.

Box NF; J.R. Wyeth; et al. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1891–1997.

Bressac-de-Paillerets B.; M.F Avril; et al. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie* (2002) 84: 67–74.

Cornetta T., F. Festa, et al. DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 2006. Vol. 66, No. 2, p. 537–545.

Debniak T., R. J. Scott, et al. XPD common variants and their association with melanoma and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment* (2006) 98: 209–215.

Eves P. C.; S. MacNeil; et al.  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma. *P e p t i d e s xxx ( 2 0 0 5 ) xxx–xxx.*

Gibbs P.; B. M. Brady; et al. The genes and genetics of malignant melanoma. *J Cutan Med Surg* 2002; Vol 6 (3): 229-235.

Healy E.; S.A. Jordan; et al. Functional variation of MC1R alleles from red-haired individuals. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2397–2402.

Hoeijmakers J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; Vol 411: 366-374.

IARC. Solar and Ultraviolet Radiation. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1992; vol 55, 316p.

Ichihashi M.; M. Ueda; et al. UV-induced skin damage. *Toxicology* 2003; Vol 189: 21-39.

Kannan K.; N.E. Sharpless; et al. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(3):1221–1225.

Kosary C.L.; L.A.G. Ries; et al. (1996). SEER Cancer Statistics Review, 1973– 1992: Table and Graphs. Bethesda, MD: National Cancer Institute.

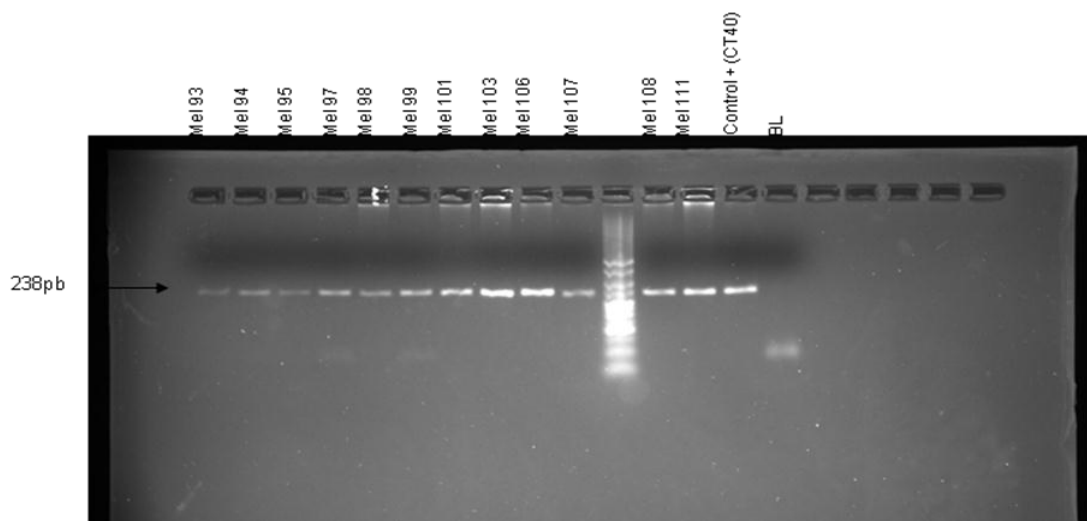
Matichard E.; P. Verpillat; et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants may increase the risk of melanoma in France independently of clinical risk factors and UV exposure. *J Med Genet* 2004;41:13-20.

Papadakis, E.N., D.N. Dokianakis, and D.A. Spandidos, p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2000. 3(6): p. 389-92.

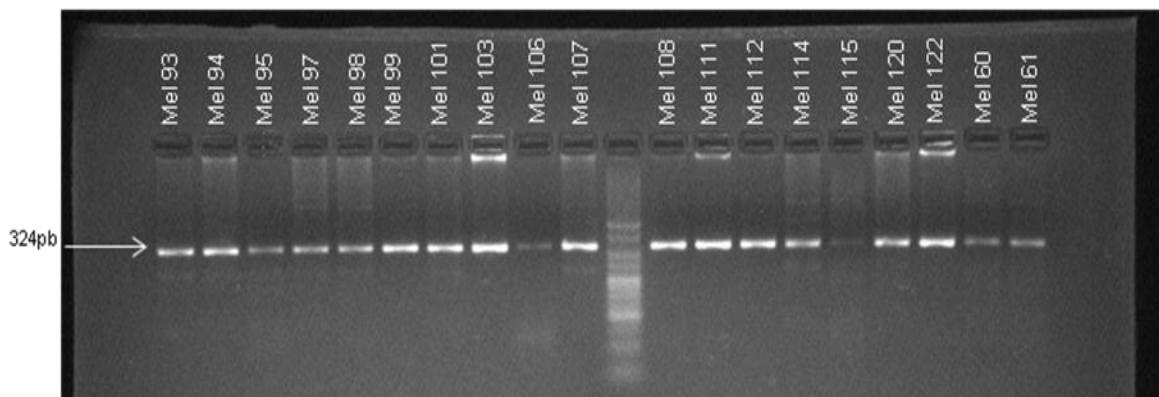
- Parkin D. M.; F. Bray; et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55: 74-108.
- Pavey S.; S. Conroy; et al. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res* 1999; 59(17):4185-9.
- Quevedo, W. c. et al. Biology of melanocytes. In: Fitzpatrick JB et al (eds). *Dermatology in general medicine*. 3d ed. New York. Mc Graw-Hill. 1987; 225.
- Qin J.Z.; V. Chaturvedi; et al. Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene* 2002; 21(19):2991-3002.
- Rees J.L. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 739-51.
- Sahai, H.a.K., A, Formulae and tables for the determination of sample size and power in clinical trials for testing differences in proportion for the two-sample design: A review. *Statistics in medicine*, 1996. 15: p. 1-15.
- Tucker M.A.; A. Halpern; et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 1997; 277:1439-1444.
- INC. Instituto Nacional de Cancerología. Anuario Estadístico 2006. Bogotá. Medilegis; 2006. p 27-28
- Sturm, R.A., Teasdale, R.D. and Box, N.F. (2001) Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene*, 277, 49-62.
- Latreille, J *et al.* MC1R gene polymorphism affects skin color and phenotypic features related to sun sensitivity in a population of French adult women. (2009). 85(6):1451-8
- Box, N.F., Wyeth, J.R., O'Gorman, L.E., Martin, N.G. and Sturm, R.A. (1997) *Hum. Mol. Genet.* 6, 1891-1897.
- Jiménez-Cervantes, C. *et al.* Thr40 and Met122 are new partial loss-of function natural mutations of the human melanocortin 1 receptor. (2006). Elsevier Science. S0014-5793 (01) 03025-3
- Schioth, H.B., Phillips, S.R., Rudzish, R., Birch-Machin, M.A., Wikberg, J.E. and Rees, J.L. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 488-491.
- Smith, R., Healy, E., Siddiqui, S., Flanagan, N., Steijlen, P.M., Rosdahl, I., Jacques, J.P., Rogers, S., Turner, R., Jackson, I.J., Birch-Machin, M.A. and Rees, J.L. (1998) *J. Invest. Dermatol.* 111, 119-122.
- Palmer, J.S., Dujoy, D.L., Box, N.F., Aitken, J.F., O'Gorman, L.E., Green, A.C., Hayward, N.K., Martin, N.G. and Sturm, R.A. (2000) *Am. J. Hum. Genet.* 66, 176-186.
- Box, N.F., Dujoy, D.L., Irving, R.E., Russell, A., Chen, W., Griffiths, L.R., Parsons, P.G., Green, A.C. and Sturm, R.A. (2001) *J. Invest. Dermatol.* 116, 224-229.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1513-1530
- Li, C; Z, Jiang; X, Liu. XPD LYS751GLN AND ASP312ASN POLYMORPHISMS AND bladder cancer risk: a meta-analysis. *Molecular biology Reports.* (2010) 37:301-309.



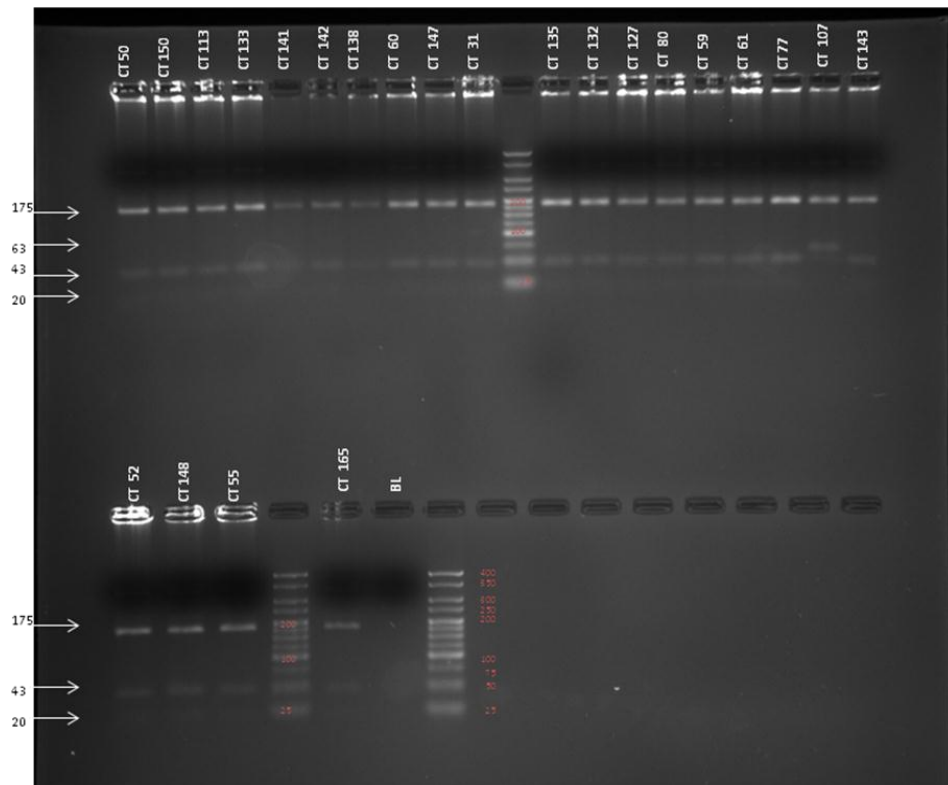
## ANEXO 1



**Figura 1:** Productos de amplificación por PCR de la región que contiene el polimorfismo Arg151Cys del gen MC1R en alguno de los casos. Gel de agarosa 3%. Marcador de peso molecular HyperLader V.

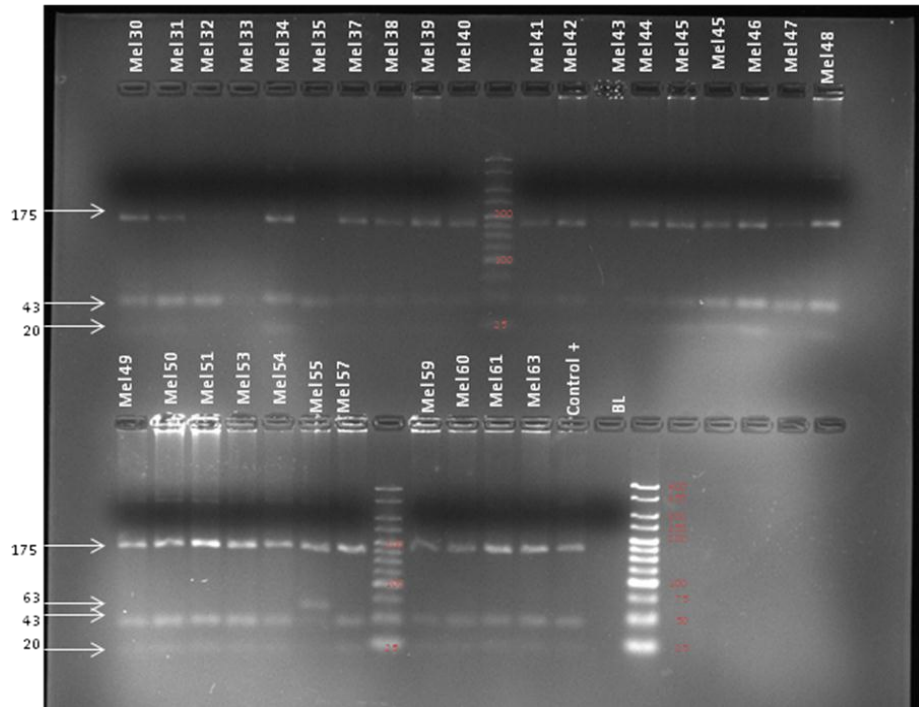


**Figura 2:** Productos de amplificación por PCR de la región que contiene el polimorfismo Lys751Gln del gen XPD en alguno de los casos. Gel de agarosa 3%. Marcador de peso molecular HyperLader V.

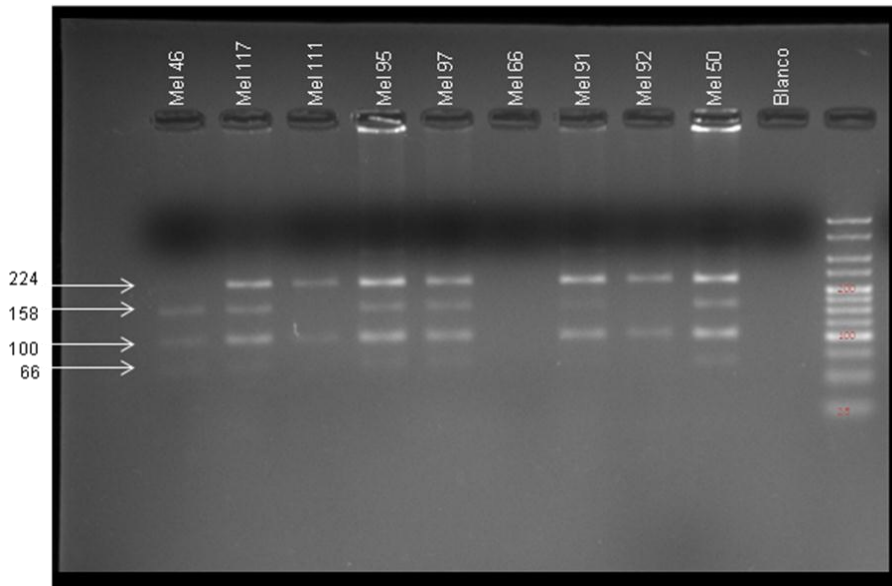


**Figura 3:** RFLPs obtenidos con la enzima HhaI de los productos amplificados por PCR que contienen el polimorfismo Arg151Cys de MC1R en alguno de los controles. Gel de agarosa 3%. Marcador de peso molecular HyperLader V.

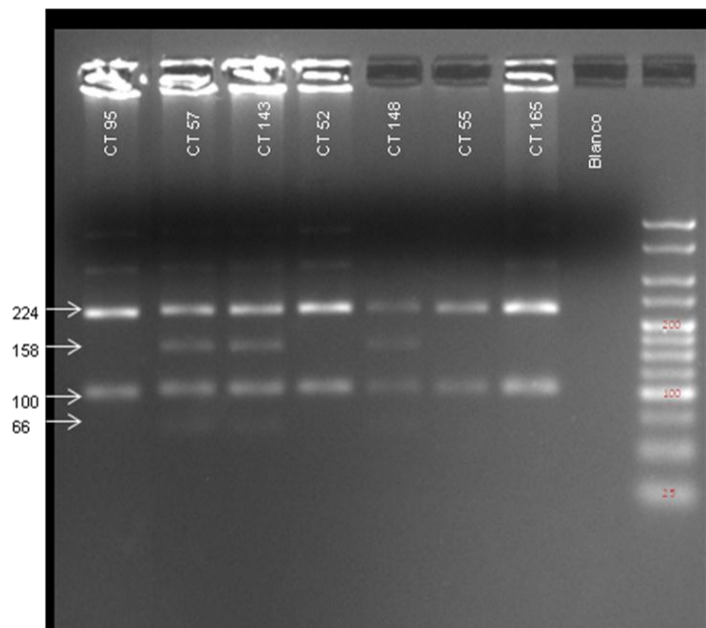




**Figura 4:** RFLPs obtenidos con la enzima Pst1 de los productos amplificados por PCR que contienen el polimorfismo Arg151Cys de MC1R en alguno de los casos. Gel de agarosa 3%. Marcador de peso molecular HyperLader V.



**Figura 5:** RFLPs obtenidos con la enzima Pst1 de los productos amplificados por PCR que contienen el polimorfismo Lys751Gln de XPD en alguno de los casos. Gel de agarosa 3%. Marcado de peso molecular HyperLader V.



**Figura 6:** RFLPs obtenidos con la enzima Pst1 de los productos amplificados por PCR que contienen el polimorfismo Lys751Gln de XPD en alguno de los controles. Gel de agarosa 3%. Marcador de peso molecular: HyperLadder V.

## ANEXO 2

**TABLA 1:** Frecuencias genóticas y alélicas del polimorfismo Lys751Gln del gen XPD.

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	FRECUENCIA GENOTÍPICA		FRECUENCIA ALÉLICA		VALORES ESPERADOS	
			CASOS N=92	CONTROLES N=92	CASOS	CONTROLES	CASOS	CONTROLES
XPD	Lys751Gln	Lys/Lys	60 (65%)	53 (58%)	148 (80%)	141 (77%)	41 (44,5%)	55 (60%)
		Gln/Gln	4 (4%)	4 (4%)	36 (20%)	43(23%)	10 (11%)	5 (5%)
		Lys/Gln	28 (30%)	35 (38%)			41 (44,5%)	32 (35%)

**TABLA 2:** Frecuencias genóticas y alélicas del polimorfismo Arg151Cys del gen MC1R.

GEN	POLIMORFISMO	GENOTIPO	FRECUENCIA GENOTÍPICA		FRECUENCIA ALÉLICA		VALORES ESPERADOS	
			CASOS N=92	CONTROLES N=92	CASOS	CONTROLES	CASOS	CONTROLES
MC1R	Arg151Cys	Arg/Arg	84 (91%)	88 (96%)	176(96%)	179(97%)	85 (92%)	87 (95%)
		Cys/Cys	0 (0%)	1 (1%)	8(4%)	5 (3%)	0	0
		Arg/Cys	8 (9%)	3 (3%)			7(8%)	5(5%)

**TABLA 3:** Análisis de la asociación características clinicopatológicas VS Grupo, utilizando prueba de Ji cuadrado.

CARACTERISTICAS CLINICO-PATOLOGICAS	CASOS N=92	CONTROLES N=92	VALOR DE P*
<b>COLOR PIEL</b>			
NEGRA	2 (2,4%)	2 (2,2 %)	0,986
MORENA	26 (30,6%)	27 (30,3%)	
BLANCA	41 (48,2%)	45 (50,6%)	
TRIGUEÑA	16 (18,8%)	15 (16,9%)	
<b>COLOR OJOS</b>			
CAFÉ	67 (80,7%)	70 (80,5%)	0,678
AZUL	2 (2,4%)	1 (1,1%)	
VERDE	8 (9,6%)	12 (13,8%)	
OTRO	6 (7,2%)	4 (4,6%)	
<b>COLOR CABELLO</b>			
NEGRO	40 (48,2%)	40 (47%)	0,921
MARRÓN OSCURO	28 (33,7%)	28 (33%)	
MARRÓN CLARO	12 (15%)	13 (15%)	
RUBIO	3 (3,6%)	5 (6%)	
<b>CIRCUSTANCIAS EXPOSICIÓN AL SOL</b>			
RECREATIVA	54 (61,4%)	61 (66,3%)	0,49
LABORAL	34(38,6%)	31(33,7%)	
<b>TIPO PIEL</b>			
TIPO I	27 (32,5%)	23 (27,7%)	0,636
TIPO II	32 (38,69%)	34 (41%)	
TIPO III	13 (15,7%)	10 (12%)	
TIPO IV	11 (13,3%)	16 (19,3%)	
<b>FAMILIARES CON CÁNCER</b>			
NO	43 (47,8%)	51 (55,4%)	0,189
C. SENO	0	1 (1%)	
CUELLO UTERINO	5 (5,6%)	3 (3,3%)	
GÁSTRICO	5 (5,6%)	8 (8,7%)	
PIEL	7 (7,8%)	3 (3,3%)	

OTRO	23 (25,6%)	15 (16,3%)
------	------------	------------

**TABLA 4:** Relación entre los polimorfismos Vs características clinicopatológicas, utilizando la prueba de Ji cuadrado.

VARIABLE	XPD			CASOS			VALOR DE P
	Lys/Lys	Gln/Gln	Lys/Gln	VALOR P	MC1R		
					Arg/Arg	Arg/Cys	
<b>COLOR PIEL</b>							
NEGRA	1 (2%)	0	1 (4%)	0,72	2 (3%)	0	0,936
MORENA	17 (33%)	1 (33%)	8 (30%)		24 (31%)	2 (29%)	
BLANCA	23 (45%)	2 (67%)	14 (52%)		37 (47%)	4 (51%)	
TRIGUEÑA	10 (20%)	0	4 (15%)		15 (19%)	1 (14%)	
<b>COLOR OJOS</b>	<b>P=0.007</b>						
CAFÉ	39 (77%)	2 (66%)	22 (80%)	0,44	62 (82%)	5 (72%)	0,98
AZUL	0	1 (33%)	1 (40%)		1 (1%)	1 (14%)	
VERDE	8 (16%)	0	0		7 (9%)	1 (14%)	
OTRO	4 (8%)	0	2 (8%)		6 (8%)	0	
<b>COLOR CABELLO</b>							
NEGRO	28 (55%)	2 (66.7%)	9 (36%)	0,81	36 (47%)	4 (57%)	0.688
MARRÓN OSCURO	13 (26%)	0	13 (52%)		27 (36%)	1 (14%)	
MARRÓN CLARO	7 (14%)	1 (33.3%)	3 (12%)		11 (15%)	1 (14%)	
RUBIO	3 (6%)	0	0		2 (3%)	1 (14%)	
<b>CIRCUNSTANCIAS EXPOSICIÓN AL SOL</b>							
RECREATIVA	33 (62.3%)	2 (50%)	18 (64.3%)	0,8	48(60%)	6 (75%)	0,477
LABORAL	20 (37.7%)	2 (50%)	10 (35.7%)		32 (40%)	2 (25%)	
<b>QUEMADURAS SEVERAS POR SOL</b>					<b>P=0.058</b>		
SI	17 (32%)	3 (75%)	8 (29%)	0,63	23 (28%)	5 (63%)	0,103
NO	37 (69%)	1 (25%)	20 (71%)		58 (72%)	3 (38%)	
<b>TIPO PIEL</b>							
TIPO I	13 (27%)	1 (25%)	11 (41%)	0,63	24 (32%)	3 (43%)	0.294

TIPO II	24 (50%)	2 (50%)	5 (19%)		29 (38%)	3 (43%)	
TIPO III	7 (15%)	0	6 (22%)		12 (16%)	1 (14%)	
TIPO IV	4 (8%)	1 (25%)	5 (19%)		11 (15%)	0	
<b>TIPO DE MELANOMA</b>							
MELANOMA IN SITU	5 (10%)	0	3 (13%)	0,158	8 (11%)	1 (13%)	0.443
M. EXTENSIÓN SUPERFICIAL	6 (12%)	0	1 (4%)		7 (10%)	0	
M. NODULAL	13 (27%)	0	3 (13%)		15 (21%)	1 (13%)	
LENTIGINOSO M. M	6 (12%)	1 (25%)	1 (4%)		7 (10%)	1 (13%)	
M. LENTIGINOSO ACRAL	19 (39%)	3 (75%)	16 (67%)		33 (47%)	5 (63%)	

**Tabla 5:** Asociación entre el polimorfismo Lys751Gln del gen XPD y el desarrollo de MMC.  
Regresión Logística

**Variables en la ecuación**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Xpd..gln.gln(1)	.124	.732	.029	1	.865	1.132	.270	4.751
Xpd..lys.gln(1)	.347	.316	1.208	1	.272	1.415	.762	2.629
Constant	-.124	.189	.433	1	.510	.883		

a. Variable(s) entered on step 1: Xpd..gln.gln, Xpd..lys.gln.

**Tabla 6:** Asociación entre el polimorfismo Arg151Cys del gen MC1R y el desarrollo de MMC.  
Regresión Logística

**Variables en la ecuación**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Mc1r..cys.cys(1)	21.156	.401	.000	1	1.000	1.542	.000	.
Mc1r..arg.cys(1)	-1.027	.694	2.192	1	.139	.358	.092	1.395
Constant	.047	.153	.093	1	.760	1.048		

a. Variable(s) entered on step 1: Mc1r..cys.cys, Mc1r..arg.cys.

