



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Identificación de variantes genéticas comunes que aumentan el riesgo de melanoma en población española. Estudio caso-control

Autora

Cristina Corredera Carrión

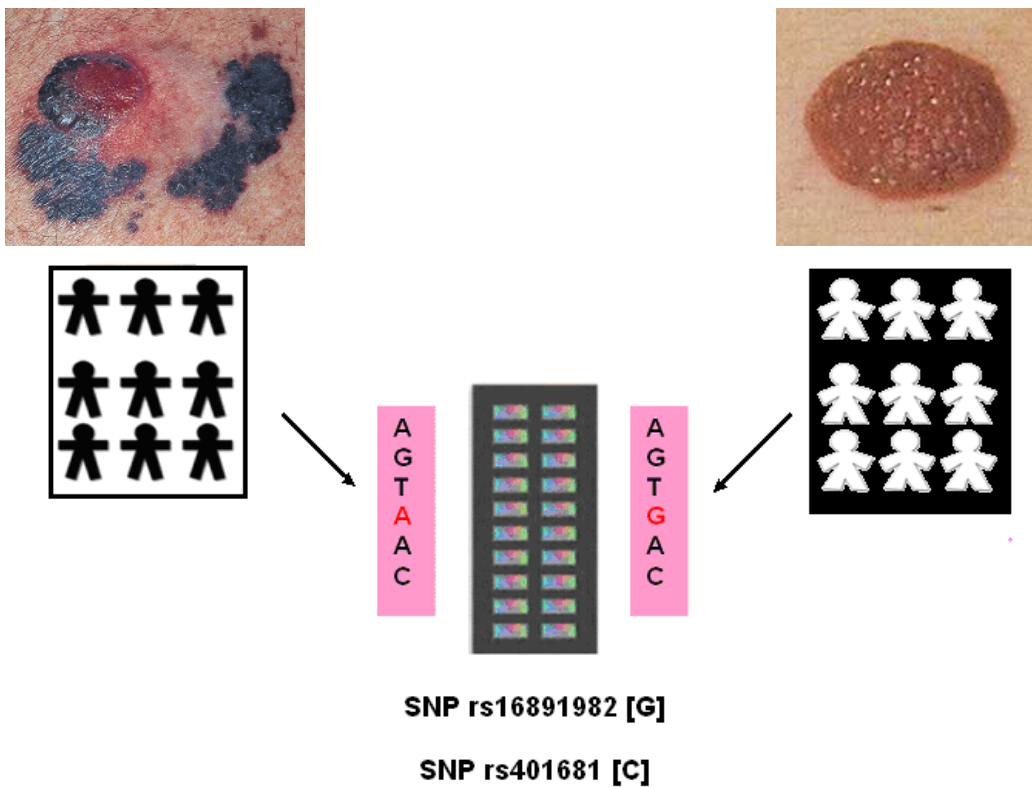
Director/es

Grasa Jordán, María Pilar Matilde
Mayordomo Cámara, José Ignacio

Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología
2011

TESIS DOCTORAL

Identificación de Variantes Genéticas Comunes que Aumentan el Riesgo de Melanoma en Población Española. Estudio Caso-Control



Cristina Corredera Carrión

Zaragoza, 2011

Directores

- Doctora María Pilar Matilde Grasa Jordán
 - Profesora Titular de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.
 - Jefe de Sección del Servicio de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.

- Doctor José Ignacio Mayordomo Cámara
 - Profesor Asociado de Oncología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.
 - Jefe de Sección de Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.

A Miguel,
Por llenar de
ilusión todos mis días.

A mis padres,
Por quererme tanto.
Por hacer de mí lo que soy.

A Doedo
Por tu fuerza,
Por ser tan grande,
Gracias por apoyarme siempre.

A Sara,
Por ser tan linda.
Por cuidar de los míos.

Agradecimientos

Gracias a Miguel,

por animarme continuamente a no abandonar en los momentos más difíciles.

Gracias a mis directores,

por tener paciencia cuando no pude, y confiar en que podría.

Índice

Abreviaturas	15
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Epidemiología del melanoma cutáneo: un problema de salud Pública	21
1.2. Los melanocitos y su entorno: la piel	27
1.3. Función del melanocito: síntesis de melanina.....	33
1.3.1. Melaninas: tipos, síntesis y regulación.....	33
1.3.2. Melanosomas.....	36
1.3.2.1. Proteínas melanogénicas.....	37
a) Enzimas.....	38
b) Proteínas estructurales.....	40
c) Otras proteínas melanogénicas.....	42
d) Proteínas reguladoras	43
1.3.2.2. Transferencia de melanosomas a los queratinocitos ..	46
1.4. Pigmentación Cutánea Basal.....	49
1.4.1. Determinantes fenotípicos de la pigmentación cutánea basal ..	49
1.4.2. Determinantes genéticos de la pigmentación cutánea basal	50
1.5. Factores de riesgo	57
1.5.1. Factores de riesgo relacionados con el ambiente.....	57
1.5.1.1. Exposición solar	57
a) Exposición solar intermitente.....	58
b) Quemaduras solares en la infancia	59

c) Latitud ecuatorial.....	60
d) Exposición a radiación ultravioleta.....	60
1.5.1.2. Exposición a agentes químicos	71
1.5.2. Fenotipo cutáneo	73
1.5.2.1. Etnia	73
1.5.2.2. Fototipo cutáneo.....	73
1.5.2.3. Presencia de efélides	75
1.5.2.4. Color de ojos y pelo.....	76
1.5.2.5. Presencia de nevus.....	79
a) Nevus melanocíticos comunes	79
b) Nevus displásicos	81
c) Síndrome del nevus displásico	81
d) Nevus congénitos	82
1.5.3. Antecedentes	84
1.5.3.1. Familiares de melanoma o nevus displásicos	84
1.5.3.2. Familiares de otros cánceres	84
1.5.3.4. Personales de melanoma y otros cánceres cutáneos .	85
1.5.4. Factores de riesgo relacionados con el genotipo.....	86
1.5.4.1. Genes de alta penetrancia	86
a) CDKN2A.....	88
b) CDK4	92
1.5.4.2. Genes de baja penetrancia	93
1.5.4.2.1. Relacionados con los rasgos pigmentarios.	94

a) <i>MCR1</i>	94
b) <i>ASIP, TYR, TYRP1, OCA2</i> y <i>SLC45A2</i> ..	96
1.5.4.2.2. No relacionados con los rasgos pigmentarios	98
a) VDR (vitamin D receptor).....	98
b) Genes de reparación del ADN, <i>MDM2, EFG, GSTM1</i> o <i>GSTT1, B-RAF</i> y <i>p53</i>	100
1.6. Factores Genéticos Implicados en el Cáncer.....	103
1.6.1. Cáncer hereditario y genes de alta penetrancia.....	103
1.6.2. Cáncer esporádico y genes de baja penetrancia	109
1.6.3. Polimorfismos	113
1.6.4. Recombinación, ligamiento/desequilibrio de ligamiento, y bloques haplotípicos.....	124
1.6.4.1. Recombinación.....	124
1.6.4.2. Ligamiento/desequilibrio de ligamiento.....	127
1.6.4.3. Bloques haplotípicos.....	129
1.7. Estudios Genéticos a Gran Escala.....	133
1.7.1. Diseño de estudios que identifican factores genéticos que predisponen a enfermedades.....	133
1.7.2. Identificación de genes que determinan susceptibilidad a una enfermedad	135
1.7.2.1. Análisis de ligamiento.....	135
1.7.2.2. Estudios de asociación.....	137

1.7.2.3. Gen candidato	137
1.7.2.4. Tipos de estudios de asociación	138
a) Método directo: estudios clásicos de asociación	138
b) Método indirecto: estudios de asociación integral del genoma (<i>genome-wide association; GWA</i>)	139
c) Inconvenientes de los estudios de asociación	141
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	143
3. OBJETIVOS	148
4. MATERIAL Y MÉTODOS	151
4. 1. Población de estudio.....	153
4.1.1. Población española.....	153
4.1.2. Poblaciones extranjeras.....	154
4. 2. Criterios de selección.....	155
4.3. Diseño de estudio	156
4.3.1. Extracción de sangre	158
4.3.2. Extracción de ADN de las muestras.....	159
4.3.3. Conservación de las muestras	160
4.4. Determinaciones y medidas del estudio, control de calidad, plan de análisis estadístico.....	161
4.4.1. Análisis genético de las muestras	161
4.4.2. Análisis estadístico	162
4.5. Aspectos éticos y legales.....	162
5. RESULTADOS.....	164
5.1. SNP rs16891982 [G].....	166

5.2. SNP rs401681 [C]	170
6. DISCUSIÓN	175
7. CONCLUSIONES.....	197
8. BIBLIOGRAFÍA	201

Abreviaturas

A	Adenina
ACTH	Hormona adenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BER	Base-excision repair: mecanismos celulares de reparación por escisión de bases
C	Citosina
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A: inhibidor 2 ^a de la cinasa dependiente de ciclina
cM	Centimorgan
CNV	Variantes estructurales o copy number variants
DOPA	Dihidroxifenilalanina
ECO	European Cancer Observatory
EFG	Factor de crecimiento epidérmico
FPS	Factor de protección solar
G	Guanina
GenoMEL	Consortio de Genética del Melanoma
GSTM1	Glutathione-S transferase mu1
GSTT1	Glutathione-S transferase theta 1

GWAs	Genome-wide association studies: estudios de asociación integral del genoma
IC	Intervalo de confianza
INDELs	Variantes de longitud que afectan hasta pocos centenares de nucleótidos
IRF4	Interferon regulatory factor 4
KITLG	Ligando del receptor tirosina kinasa KIT
LAMP	Proteínas de membrana asociadas con lisosomas
LD	Linkage disequilibrium: desequilibrio de ligamiento
m ²	Metros cuadrados
MCR	Receptor de melanocortina
MEN2A	Multiple endocrine neoplasia type 2A: neoplasia endocrina multiple tipo 2A
Mitf	Factor de transcripción asociado con microftalmía
mm	Milímetros
NER	Mecanismos celulares de reparación por escisión de nucleótidos
OCA	Albinismo oculocutáneo
OR	Odds ratio: razón de probabilidades. En los estudios de caso-control, es el homólogo al riesgo relativo de los estudios prospectivos o de cohorte
p	Grado de significación estadística: probabilidad de equivocarse si rechazamos la hipótesis nula (no hay asociación entre las dos variables estudiadas)
p14 ^{ARF}	Alternative Reading Frame: fragmento de lectura alternativo

PCK	Proteincinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POMC	Proiomelanocortina
pRb	Proteína del retinoblastoma
RHC	Red hair color: fenotipo pelo rojo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirido
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
T	Timina
Tag SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido marcadores
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa
TRP-1	Proteínas relacionadas con tirosinasa tipo 1
TRP-2	Proteínas relacionadas con tirosinasa tipo 1 o DOPA tautomerasa
TYR	Gen que codifica la enzima tirosinasa
UV	Ultravioleta
UVA	Radiación ultravioleta A
UVB	Radiación ultravioleta B
UVC	Radiación ultravioleta C
VDR	Vitamin D receptor: receptor de la vitamina D
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia adquirida
VNTR	Variable number of tandem repeats: número variable de repeticiones en tandem
α -MSH	Hormona estimulante de los melanocitos alfa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del melanoma cutáneo: un problema de salud pública.

El melanoma cutáneo representa el 4% de los cánceres dermatológicos y es el responsable del **90% de las muertes por cáncer de piel**. Además, el melanoma es una de las neoplasias que provoca una mayor cantidad de años de vida potencialmente perdidos. Se trata del cáncer más frecuente en adultos de raza blanca entre 25 y 30 años de edad (Aceituno-Madera y cols., 2010). Además, solo el 14% de los pacientes con melanoma metastásico sobreviven a los 5 años (Miller y Mihm, 2006).

El melanoma es un cáncer con una **elevada agresividad**, que ha mostrado un aumento de la incidencia mundial mayor que el de cualquier otra neoplasia (Nagore y cols., 2009) y que presenta índices epidemiológicos diferentes a cualquier otro tumor. El **aumento anual de las tasas de incidencia** varía entre el **3 y el 7%** en los diferentes países de población caucásica. Con este incremento, se estima que **cada 10 o 20 años se duplica la incidencia**, por lo que se trata de uno de los tumores malignos que más ha aumentado en la población blanca en los años finales del siglo XX (Bloethner y cols., 2009). Igualmente es uno de los 10 tumores malignos más frecuentes en el mundo occidental, pero es raro en la mayoría de países de África, Asia y Sudamérica (Diepgen y Mahler, 2002).

La estadística del cáncer en **Estados Unidos** informó de la existencia de **6 casos por 100.000** habitantes al comienzo de los años 70 y **18 casos por 100.000** habitantes y año a principios del 2000, demostrando así **que las tasas de incidencia se han triplicado**. En el mismo periodo de tiempo las tasas de incidencia en **Europa** sufrieron un aumento similar, **de 3-4 casos a 10-15 casos por 100.000** habitantes y año. La Autoridad Federal para la Salud en Alemania ha utilizado los registros poblacionales de varias regiones para estimar la evolución de la incidencia del melanoma cutáneo, observando un aumento del triple durante un periodo de tres décadas (Garbe y Leiter, 2009) (Figura 1).

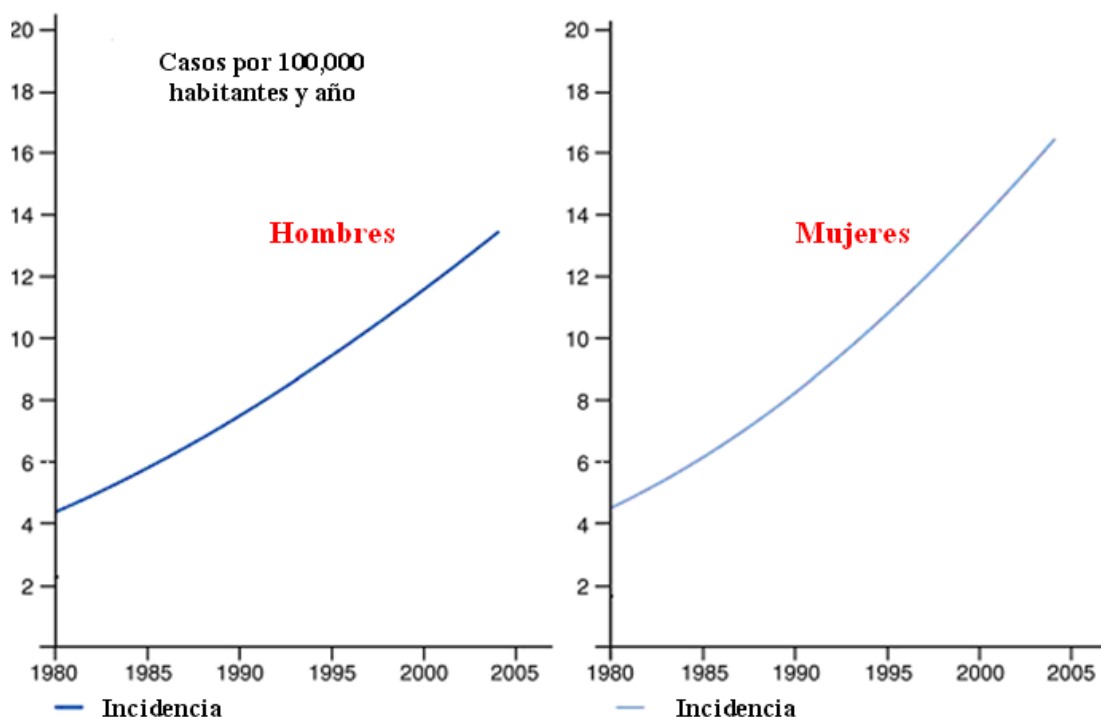


Figura 1: Tendencia de la incidencia de melanoma en Alemania estandarizada por edad (población europea estándar) durante 25 años. Fuente: Modificado de Garbe y Leiter, 2009.

En general, la **incidencia mundial** de melanoma aumenta a medida que nos acercamos al Ecuador, mientras que en Europa ocurre lo contrario. Probablemente se deba al fototipo más claro de la población del norte de Europa y a la exposición solar intensa a la que se someten en periodos vacacionales (Ródenas y cols., 1996). Las **mayores tasas** de incidencia se observan en Australia y Nueva Zelanda con 56 casos por 100.000 habitantes, sin diferencias estadísticamente significativas entre hombre y mujeres (Bloethner y cols., 2009; Leiter y Garbe, 2008), lo que supone más del doble de las tasas más altas de Europa (Parkin y cols., 1997), seguidas de las de América del Norte y Europa del Norte. Con esta incidencia, el melanoma en Australia se ha convertido en el **cuarto tumor más frecuente en varones**, después del cáncer de próstata, de colon y de pulmón, y el **tercero más frecuente en mujeres**, tras el de mama y de colon, con lo que se ha convertido en un importante problema de salud pública. Actualmente se estima que uno de cada 25 varones y una de cada 34 mujeres en Australia desarrollarán un melanoma a lo largo de su vida (Stratigos y Katsambas, 2009). Por otro lado, las tasas de incidencia más bajas, corresponden a los países del este, sur y suroeste de Asia (Garbe y Leiter, 2009).

En **Europa** la incidencia es muy superior en los países del norte del continente, con tasas estimadas para el año 2002 de 8,4 casos por 100.000 en hombres y 10 en mujeres, frente a 6 casos por 100.000 en los del sur del continente. Estas diferencias también se observan, aunque en menor medida,

en la mortalidad, con tasas para 2002 de 2,2 y 1,6 casos por 100.000 en hombres y mujeres del norte europeo y de 1,6 y 1,1 en varones y mujeres del sur. **Suecia, Noruega, Islandia y Dinamarca** tienen las *tasas de incidencia de melanoma más elevadas del mundo*, junto con Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (Ferlay y cols., 2004).

En **España** también se ha producido un aumento de la incidencia de melanoma en los últimos 30 años (Aceituno-Madera y cols., 2010). Entre los años 1969-1972, la tasa de incidencia era de 0,3 y de 0,2 por 100.000 habitantes en varones y mujeres, respectivamente, ascendiendo a 3 y 3,8 en 1992. Esto supone que, en 20 años, la tasa de incidencia de melanoma en España se multiplicó más de 10 veces (Sáenz y cols., 2005). Los últimos datos publicados sobre la incidencia de melanoma a nivel europeo, son los aportados por el ECO (European Cancer Observatory) referentes al año **2008**, con una incidencia estimada de melanoma cutáneo en España de **6,33 y 7,09 por 100.000 habitantes** (Figuras 2 y 3), y una mortalidad de 1,72 y 1,16 por 100.000, en hombres y mujeres, respectivamente (European Cancer Observatory, 2010).

Algunos autores consideran que el incremento de incidencia de melanoma cutáneo no es real, sino que responde a un sobrediagnóstico de casos indolentes. Sin embargo, el aumento de la mortalidad por melanoma y de la incidencia de tumores primarios gruesos detectados por algunos estudios,

sugiere que este incremento de incidencia no es sólo aparente (Marcoval y cols., 2008).

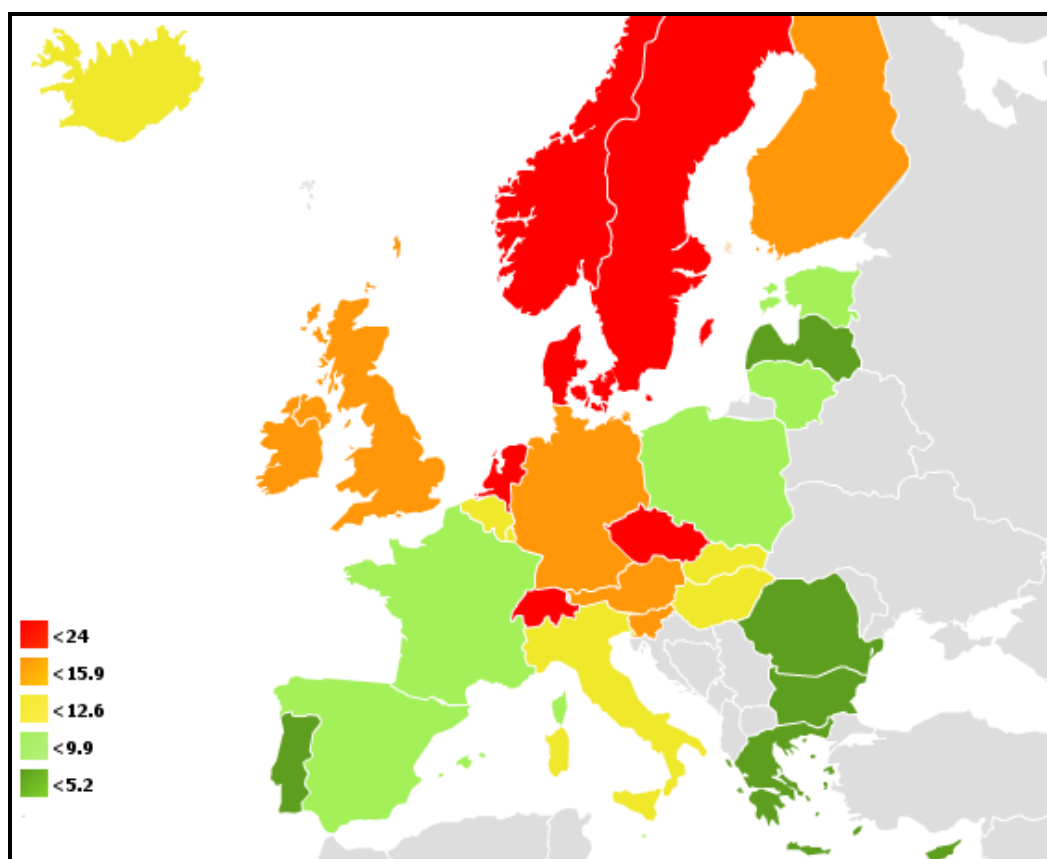


Figura 2: Incidencia europea estimada por 100.000 habitantes de melanoma cutáneo en hombres, 2008. Fuente: European Cancer Observatory, 2010.

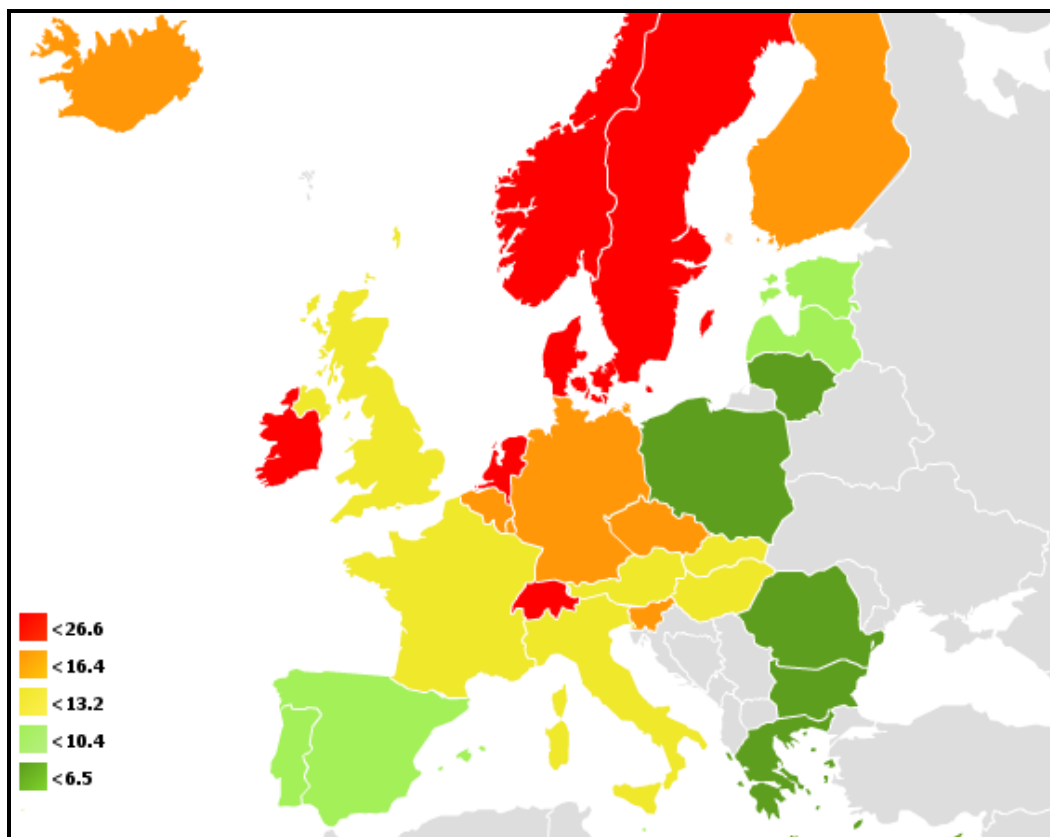


Figura 3: Incidencia europea estimada por 100.000 habitantes de melanoma cutáneo en mujeres, 2008. Fuente: European Cancer Observatory, 2010.

1.2. Los melanocitos y su entorno: la piel.

El melanoma surge por la transformación neoplásica de los melanocitos que son células cuya característica más específica es la capacidad de sintetizar pigmentos (Wolff y cols., 2008).

Los melanocitos **se localizan** fundamentalmente en la **piel**, entre los queratinocitos basales de la epidermis y el folículo piloso. Pueden encontrarse también en **otras localizaciones**, como coroides, mucosa oral o genital, nervios periféricos, cadena simpática o leptomeninges. Proceden de células pluripotenciales de las crestas neurales que durante el desarrollo embrionario se diferencian en el embrión siguiendo dos caminos: el “ventral”, que da lugar a las neuronas y células gliales del sistema nervioso periférico, y el “dorsolateral”, del que surgen las células pigmentarias. Los precursores de las células pigmentarias se denominan melanoblastos. Estos migran a la dermis y se diferencian, probablemente bajo la influencia de la α -MSH y otros factores, aunque mantienen capacidad de proliferar a lo largo de toda su vida (Wolff y cols., 2008). Posteriormente, se desplazan a la capa basal de la epidermis donde se localizan siguiendo un patrón no aleatorio, con cinco o seis queratinocitos entre cada célula. Desde allí emiten prolongaciones dendríticas que entran en contacto con los queratinocitos de las capas basal y superficial (Walker y Hayward, 2002) (Figura 4).

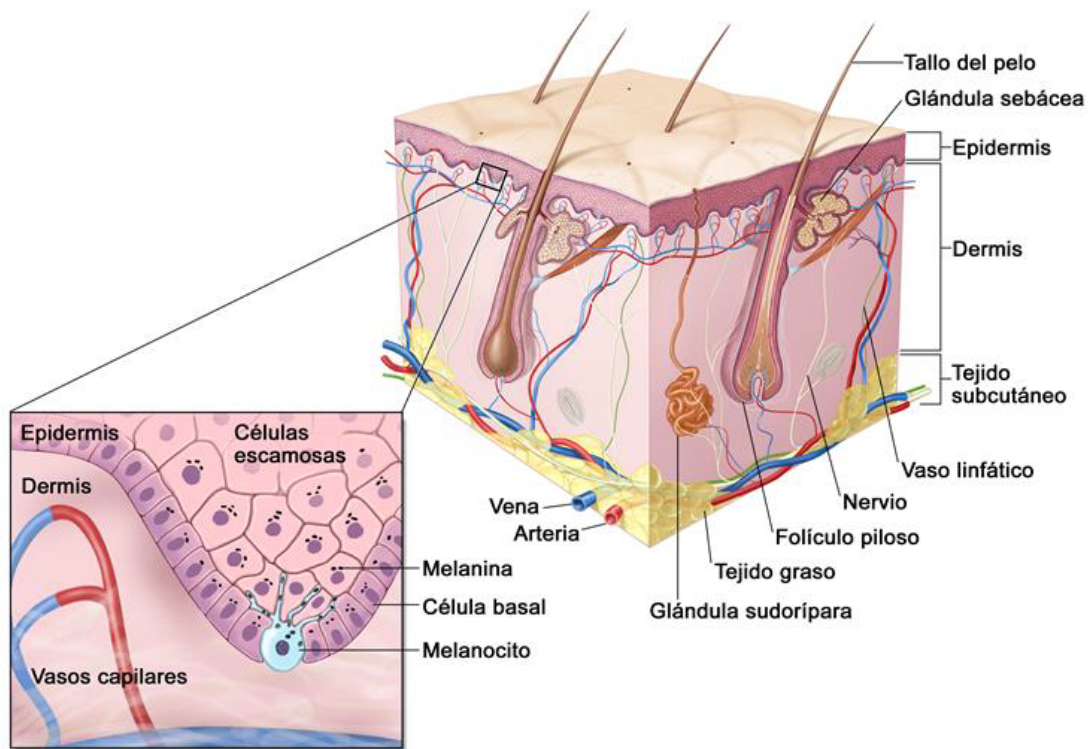


Figura 4. Representación esquemática de la piel. Detalle aumentado de un melanocito en el recuadro infero-izquierdo. Fuente: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/melanoma/HealthProfessional>

La piel es un órgano complejo que abarca toda la superficie del cuerpo, y se continúa con las membranas mucosas que recubren los orificios del cuerpo. Representa alrededor del **15% del peso total del cuerpo adulto**, con una superficie de 1,6 m² a 1,9 m², y por tanto es el **órgano más grande** del cuerpo (McKee, 1996). Además, muestra considerables variaciones regionales en relación con su espesor (que varía de 1 a 4 mm), la distribución de los anejos epidérmicos, y la **densidad de los melanocitos** (Figura 5), entre otras características (McKee, 1996; Murphy, 1997; Marín y Del Pozo, 2005).

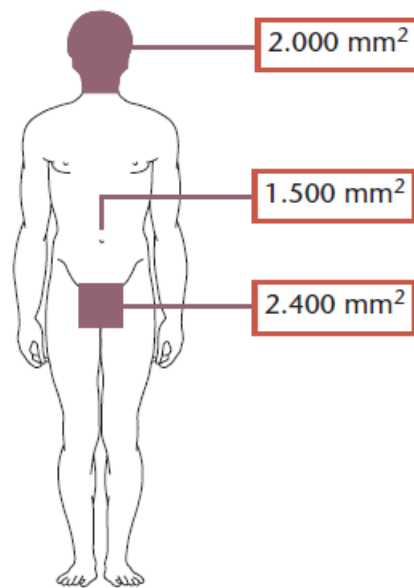


Figura 5. Distribución de los melanocitos en el cuerpo humano. Fuente: Marín y Del Pozo, 2005.

La piel ejerce múltiples funciones gracias a una elaborada estructura, que asocia tejidos de distintos orígenes (epitelial, conjuntivo, vascular, muscular y nervioso). Éstos están organizados en tres niveles de arriba abajo: epidermis, dermis e hipodermis (Mckee, 1996; Murphy, 1997) (Figura 4).

a) **La epidermis** (y sus apéndices asociados, los folículos pilosos o unidades pilosebáceas y las glándulas sudoríparas). Es un epitelio estratificado que se renueva continuamente. Está constituida por distintos tipos de células:

- Los **queratinocitos** epidérmicos (90-95%): provienen de divisiones mitóticas de las células madre de la capa basal, y van ascendiendo

hacia la superficie de la piel, a medida que sufren diversas diferenciaciones morfológicas y bioquímicas (queratinización), desprendiéndose en unos 30 días (Mckee, 1996). Se disponen en capas continuas (Kanitakis, 2002) (Figura 6).

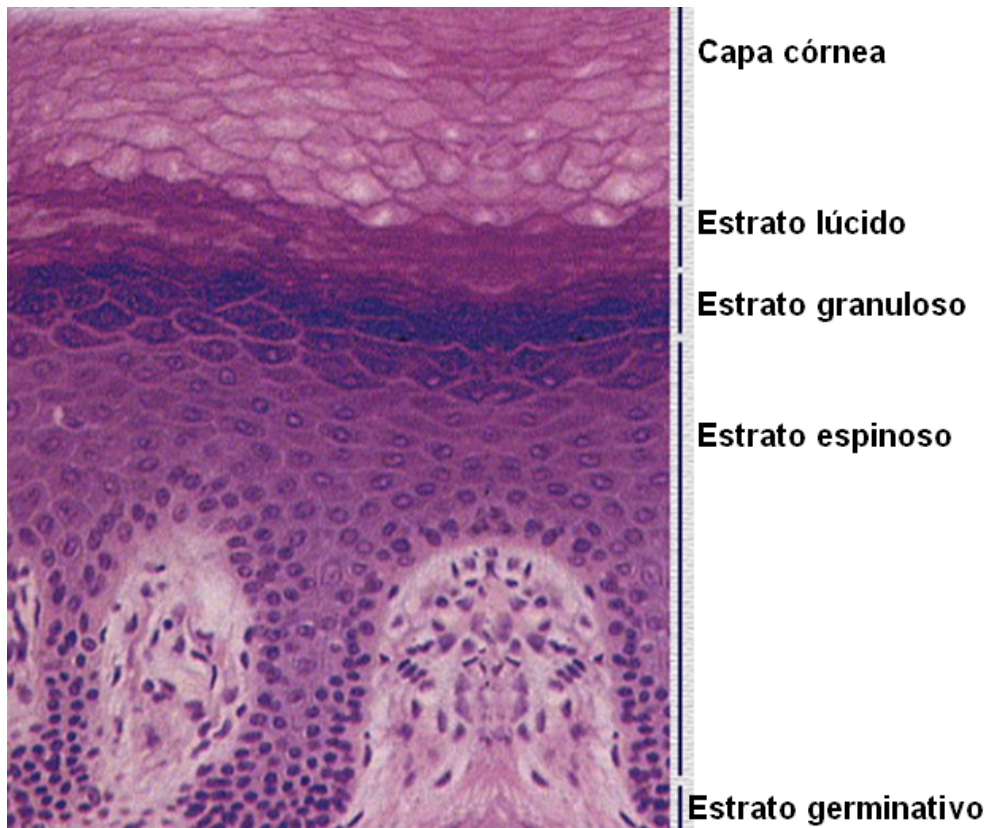


Figura 6: Capas de la epidermis. Fuente: Modificado de <http://www.iqb.es/dermatologia/homepage.htm>

- El resto de las células epidérmicas (5-15%):
 - **Células de Langerhans** (3-6%): Son células móviles, dendríticas y presentadoras de antígenos. Están presentes en todos los

epitelios estratificados y derivan de los precursores hematopoyéticos CD34+ de la médula ósea (Stoitzner y cols., 2002; Wang y cols., 2009).

- **Las células de Merkel:** Están localizadas en la capa basal de la epidermis y la vaina epitelial de los folículos pilosos. Muestran rasgos tanto neuroendocrinos como epiteliales, y su ontogénesis no se ha establecido aún (cresta neural o células madre de la epidermis). Parecen funcionar como mecanorreceptores, como lo sugiere su contacto frecuente con los axones sensoriales dérmicos con los que forman uniones sinápticas (Boulais y cols., 2009).
- **Melanocitos:** Como se ha comentado, se originan de la cresta neural y migran hacia la epidermis donde producen melanina, el pigmento natural más importante de la piel (Murphy, 1997) (Figura 7).

b) **La dermis** es la capa intermedia de la piel. Forma la mayor proporción de la piel y constituye el verdadero soporte de este órgano. Tiene un espesor de unos cuatro milímetros. Se divide en tres zonas de superficial a profundo: *dermis papilar*, *dermis reticular* y *dermis profunda*; y está formada por un complejo sistema de fibras entrelazadas, embebidas de una sustancia denominada "sustancia fundamental", en la cual se sitúan una extensa

variedad de tipos de células, donde los fibroblastos son las células fundamentales (Kanitakis, 2002).

c) **La hipodermis** o tejido celular subcutáneo es la capa más profunda de la piel. Se halla constituida por multitud de adipocitos (células grasas), dispuestos en lóbulos, separados entre sí por trabéculas de haces de fibras colágenas y elásticas. Protege al organismo proporcionándole amortiguación y aislamiento térmico (Kanitakis, 2002).

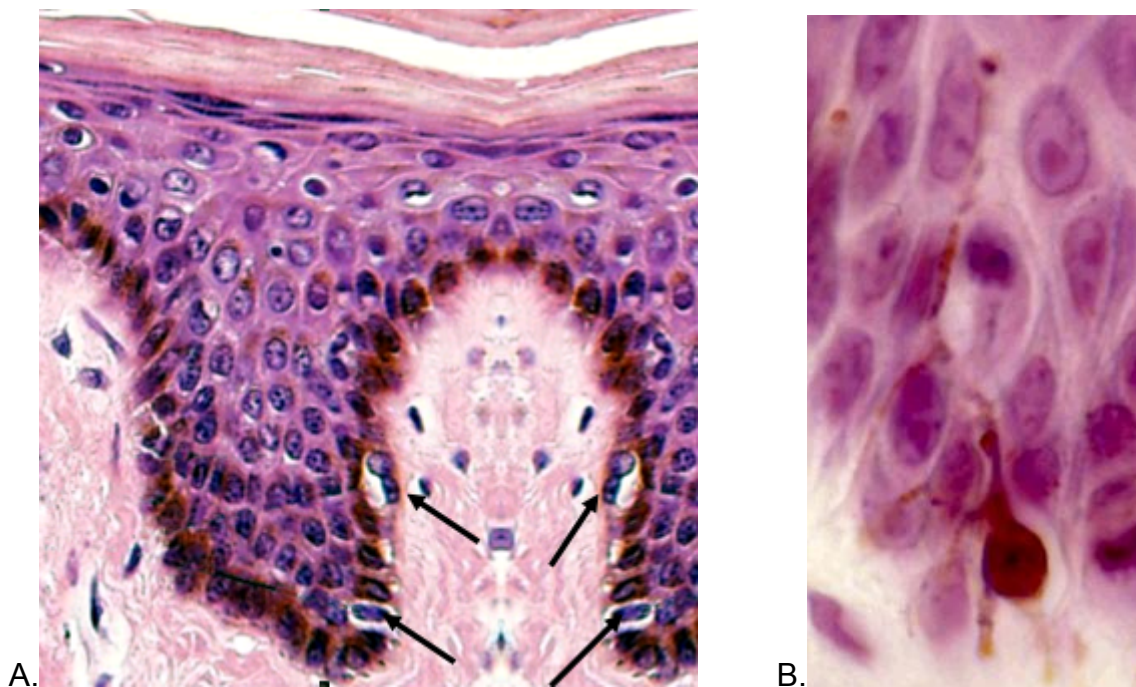


Figura 7: A. Los melanocitos (flechas) se localizan en la capa basal de la epidermis, entre los queratinocitos. B. Imagen a mayor aumento de un melanocito.

1. 3. Función del melanocito: síntesis de melanina

1.3.1. Melaninas: tipos, síntesis y regulación

Las **melaninas** son pigmentos especializados que no pertenecen a ninguna clase bioquímica conocida, sino que constituyen un conjunto de moléculas afines con diferentes grados de polimerización y oxidación, que permiten clasificarlas en dos grandes grupos (Ito y Wakamatsu, 2008):

- **Eumelaninas**. De color pardo o negro, contienen azufre y proporcionan las coloraciones oscuras.

- **Feomelaninas**. Pigmentos amarillos o rojo-parduscos que integran mayor proporción de azufre que las anteriores. Son responsables de las coloraciones claras.

A partir de la mezcla de los dos tipos fundamentales de melaninas (eumelanina y feomelanina), se forma una gran variedad de melaninas en función de la mayor o menor cantidad de una u otra, que dan lugar a su vez a un número indefinido de pigmentaciones diferentes entre los humanos (Simon y cols., 2009) (Figura 8).



Figura 8: Espectro de colores de las eumelaninas y feomelaninas. Fuente: http://es.ask-schwarzkopf.com/image_viewer/51.

Cada tipo de melanina está constituida por un núcleo central de feomelanina envuelto por una capa variable de eumelanina (Ito y Wakamatsu, 2008) (Figura 9).

La exposición a la **radiación UV** incrementa la concentración de ambos tipos de melanina, pero es la **eumelanina** la que se correlaciona mejor con el *bronceado cutáneo* y *tiene mayor función fotoprotectora*. La **feomelanina**, más lábil y fotosensible, tiene mayor potencial para generar radicales libres en respuesta a la radiación UV, que podrían dañar el ADN, *potenciando así los efectos fototóxicos* de dicha radiación (Kadekaro y cols., 2003a).

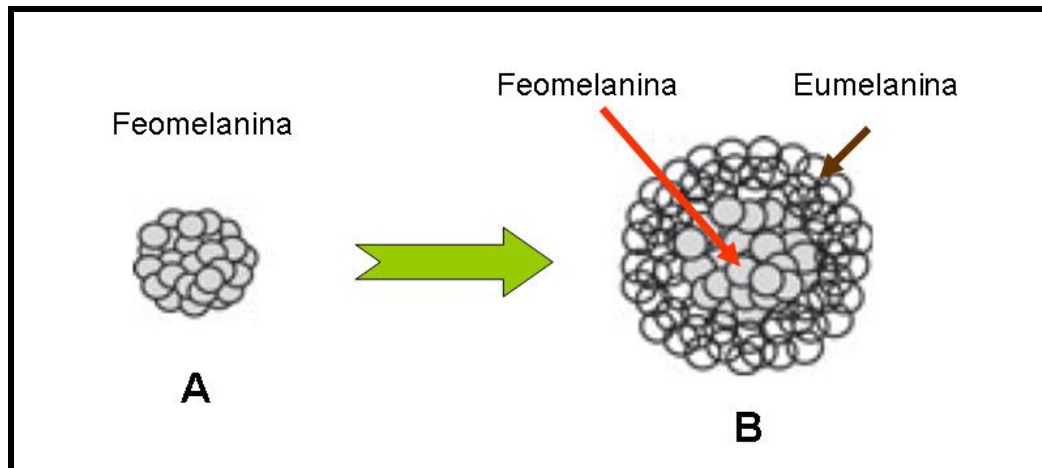


Figura 9: Core de feomelanina (A), sobre el que se añade una envoltura de eumelanina (B). Modificado de Ito y Wakamatsu, 2008.

El predominio de uno u otro tipo de melanina depende principalmente del receptor de la melanocortina **MCR1** de los melanocitos. Sus **agonistas** son la melanocortina -también llamada **α -MSH** u hormona estimulante de los melanocitos- y la **ACTH**, que estimulan la proliferación y la melanogénesis en los melanocitos con formación de *eumelanina*, y su **antagonista** es una proteína denominada **Agouti**, que al unirse a MCR1 desvía la síntesis de melanina hacia la formación de *feomelanina* (Scott y cols., 2002). (Ver, más adelante, Proteínas melanogénicas: proteínas reguladoras).

La síntesis de las melaninas tiene lugar en el interior de unas organelas especializadas llamadas **melanosomas**. El **precursor** común de ambos tipos de melanina es el aminoácido **tirosina**, sobre el que actúa la enzima *tirosinasa* que cataliza su oxidación para sintetizar **DOPA** (dihidroxifenilalanina) y para

producir, a continuación, un compuesto intermediario común: la **dopaquinona**. A partir de este punto, vías distintas conducen a la formación de las eumelaninas y de las feomelaninas (Simon y cols., 2009; Sturm, 2009) (Figura 10).

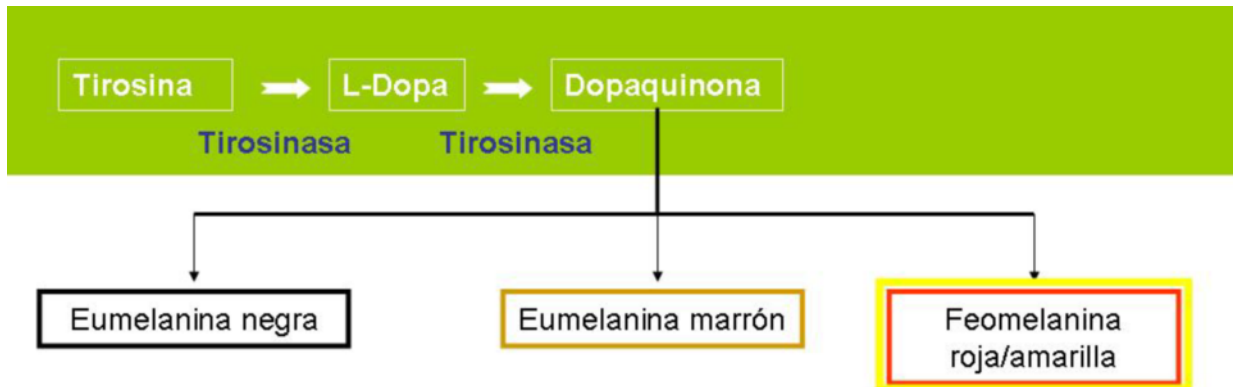


Figura 10: Vía común de la síntesis de las distintas melaninas. Modificado de Wolff y cols, 2008.

1.3.2. Melanosomas

Los melanosomas, como se ha mencionado anteriormente, son organelas presentes en el citoplasma de los melanocitos y especializadas en la síntesis de melanina. El melanosoma pasa por cuatro estadios de maduración (I, II, III y IV) (Figura 11), desde una organela carente de melanina hasta convertirse en una organela completamente melanizada. Según el tipo de

melanina sintetizada, los melanosomas se dividen en **eumelanosomas**, si contienen mayor cantidad de eumelanina, y **feomelanosomas**, si contienen mayor cantidad de feomelanina (Slominski y cols., 2004).

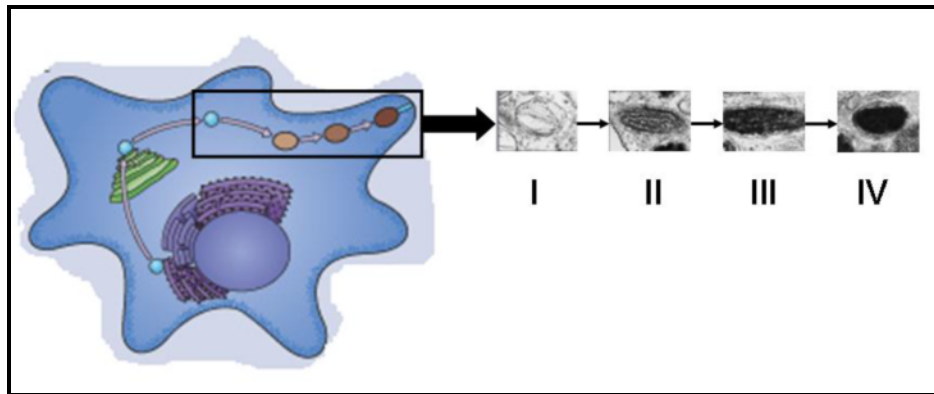


Figura 11: Síntesis de melanosomas. Diseño propio a partir de Bologna y cols., 2004; Slominski y cols, 2004.

1.3.2.1. Proteínas melanogénicas

A partir del retículo endoplásmico, se sintetiza el melanosoma en estadio I, al que habrán de agregarse proteínas sintetizadas en el aparato de Golgi para sufrir su maduración completa hasta el estadio IV (Sturm, 2006) (Figura 12).

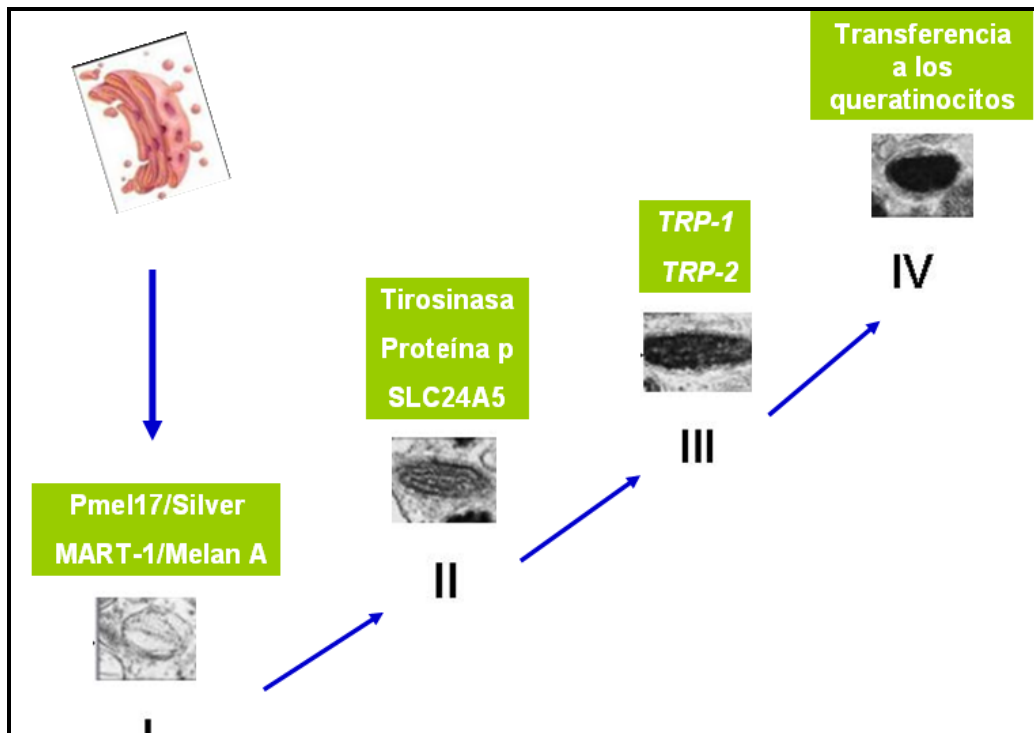


Figura 12: Incorporación de las proteínas melanosómicas en el proceso de maduración del melanosoma. Diseño propio.

Las proteínas de los melanosomas son de dos tipos, enzimas y proteínas estructurales:

a) Enzimas:

- **Tirosinasa:** es una glicoproteína anclada en la membrana del melanosoma. Constituye la enzima más relevante en la síntesis de melaninas. Su gen se localiza en el **cromosoma 11** y la enzima consta

de tres dominios o partes: un dominio melanosómico citoplasmático, un dominio melanosómico transmembrana y un dominio interno. Este último contiene la región catalítica que requiere de iones de cobre para su actividad y representa alrededor del 90% de la proteína. Las mutaciones que implican su inactivación provocan el *albinismo oculocutáneo de tipo I* (Jawaid y cols., 2009).

- **Proteínas relacionadas con tirosinasa (TRP):** son dos, TRP-1 y TRP-2, y al igual que la tirosinasa, son glicoproteínas localizadas dentro de los melanosomas y abarcan la membrana melanosómica.
 - **TRP-1:** En el hombre su gen se localiza en el **cromosoma 9**. No se conoce bien la función exacta de la TRP-1 en la melanogénesis humana, aunque sabemos que en los ratones cataliza el paso de ácido 5,6-dihidroindol-2-carboxílico a eumelanina, mientras que en el hombre, esta reacción es llevada a cabo por la tirosinasa (Ito y Watamatsu, 2008). No obstante, la TRP-1 parece ser necesaria para la síntesis de melanina, ya que su ausencia determina el **albinismo oculocutáneo tipo 3**. Además, recientemente se ha descubierto que la TRP-1 forma complejos con la tirosinasa para darle estabilidad (Kobayashi y Hearing, 2007).

- **TRP-2:** Denominada también DOPAcrómico tautomerasa, se localiza en el **cromosoma 13**. Es bien conocida su participación en varias de las reacciones de la biosíntesis de melanina. Además forma complejos con la tirosinasa y con la TRP-1 (Simon y cols., 2009) (Figura 13).

- **Proteincinasa C-β:** las proteincinasas constituyen una familia de al menos 12 isoformas. La PCK C-β es una proteína presente en el citoplasma del melanocito, que se transloca a la membrana del melanosoma para permitir la fosforilación que activa a la tirosinasa (Voris y cols., 2010).

b) Proteínas Estructurales

Son proteínas que forman parte de la matriz del melanosoma y que son necesarias para el depósito apropiado de melanina.

- **Pmel17:** también recibe el nombre de glicoproteína 100 y producto del **locus silver**. Desempeña un papel crucial en la formación de la matriz fibrilar de los eumelanosomas, contribuye a dar forma de elipse a los melanosomas y es imprescindible para la melanogénesis. La ausencia de esta proteína estructural en melanomas, aumenta la sensibilidad a algunos quimioterápicos (Xie y cols., 2009).

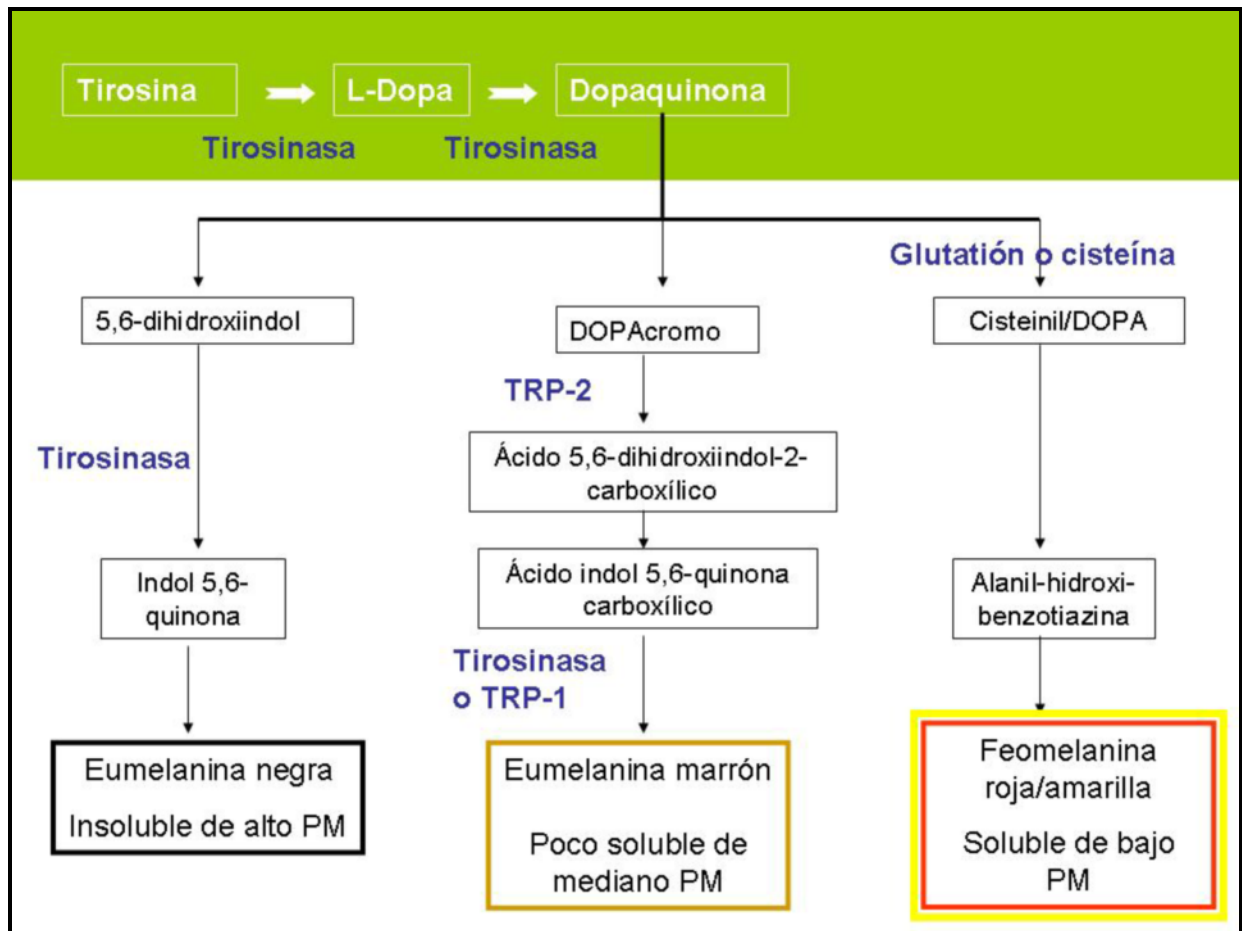


Figura 13: Enzimas principales implicadas en la biosíntesis de eumelanina y feomelanina. Para la síntesis de eumelanina son necesarias la tirosinasa, la TRP-1 y la TRP-2, mientras que para la síntesis de feomelanina sólo es necesaria la tirosinasa junto con el aminoácido cisteína (Simon y cols., 2009. Modificado de Wolff y cols., 2008).

- **MART-1/Melan A:** presente en la membrana del melanosoma en estadio I y II para estabilizar a Pmel17 mediante la formación de complejos con ella (Wolff y cols, 2008).

c) Otras proteínas melanogénicas

- **Proteína p:** es una proteína transmembrana que funciona como un intercambiador aniónico, controlando el pH melanosómico. Los individuos que presentan ausencia funcional de esta proteína presentan ***albinismo oculocutáneo tipo 2*** (Puri y cols., 2000).

- **Complejos heterotriméricos de proteínas adaptadoras:** facilitan la asignación de las proteínas asociadas a la membrana, como tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y Pmel17. Defectos de estos complejos padecen el *síndrome de Hermansky-Pudlak*, un trastorno autosómico recesivo de albinismo oculocutáneo, disfunción plaquetaria y enfermedad pulmonar (Wolff y cols., 2008).

- **SLC24A5:** también llamada NCKX5, se cree que es una proteína de intercambio catiónico. Las mutaciones de SLC24A5 en el pez cebra provocan hipopigmentación del organismo. El homólogo humano ancestral se expresa en individuos de piel más oscura, como africanos y asiáticos, mientras que el alelo variante se expresa en europeos (Lamason y cols., 2005; Sturm, 2006).

- **SCL24A4:** perteneciente a la misma familia que la proteína anterior. Su asociación con las características pigmentarias se ha descrito más

recientemente, en un análisis del genoma completo en islandeses y holandeses (Sulem y cols., 2007).

- **MATP:** también conocida como SLC45A2 o AIM1. Es una proteína transportadora asociada a la membrana del melanosoma. Mutaciones del gen que codifica esta proteína origina el **albinismo oculocutáneo tipo 4**. Además estudios recientes indican que está implicada en la diversidad de la pigmentación cutánea humana normal (Norton y cols., 2007).
- **Proteínas de membrana asociadas con lisosomas (LAMP):** protegen la integridad de los melanosomas al eliminar radicales libres que se producen durante la síntesis de melanina (Wolff y cols., 2008).

d) Proteínas reguladoras

- **Factor de transcripción asociado con microftalmía (Mitf):** Es el gen maestro de la supervivencia del melanocito y es un factor clave para regular la transcripción de las principales proteínas melanogénicas en la fisiología de las células pigmentadas normales, como tirosinasa, TRP-1, TRP-2, PKC-Beta y MART-1. Uno de los mecanismos por los que Mitf promueve la supervivencia de los melanocitos es por regular

positivamente la expresión de bcl-2, que actúa como proteína antiapoptótica (Miller y Mihm, 2006).

Además, Mitf tiene un interés reciente y creciente en cuanto a su participación en la biología del melanoma (Wellbrock y cols., 2008). Se ha detectado una amplificación de las secuencias del gen Mitf y del ARN resultante de su transcripción en el 10% de los melanomas primarios y hasta en el 20% de los melanomas metastáticos (Hocker y cols., 2008). Está también implicado en la actuación del oncogén BRAF en el melanoma, y ha sido relacionado con tumores de peor pronóstico y resistencia a la quimioterapia (Garragay y cols., 2005), lo que convierte a Mitf en una diana terapéutica de estudio en grupos de trabajo recientes (Nakai y cols., 2010).

- **Receptor de melanocortina 1:** los receptores de melanocortina (MCR) son una familia de 5 receptores (MCR1, MCR2, MCR3, MCR4 y MCR5) que tienen cada uno, siete dominios transmembrana y pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Cada tipo de MCR predomina en determinados lugares del organismo (Tabla 1). El MCR1 es el que se localiza en los melanocitos.

- **Agonistas de MCR-1:** Son las isoformas α , β , y γ , de hormona estimulante del receptor de melanocortina (α -MSH, β -MSH y γ -MSH), y la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La α -MSH y la ACTH tienen la

misma afinidad por el MCR1, y por tanto son sus estimuladores fundamentales, mientras que la afinidad de β -MSH y γ -MSH es menor. La interacción entre MCR1 y cualquiera de sus ligandos induce la activación dependiente de proteínas G de la adenilciclasa, que aumenta los niveles intracelulares de AMPc, que induce la transcripción de Mitf. El resultado final es la síntesis de eumelanina marrón/negra.

Receptores de melanocortina	Localización principal	Localización minoritaria
MCR-1	Melanocitos	Queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células presentadoras de antígeno
MCR-2	Corteza adrenal	Adipocitos
MCR-3	Cerebro	Intestino, placenta
MCR-4	Cerebro	
MCR-5	Tejidos periféricos	Glándulas sebáceas, fibroblastos, adipocitos

Tabla 1: Receptores de melanocortina: Tipos y distribución. Modificado de Bologna y cols., 2004.

- **Antagonista:** Agouti. Es una proteína que antagoniza la alfa-MSH por unión competitiva con MCR-1. Agouti se expresa tanto en los ratones como en los seres humanos. En los ratones determina el color amarillo del pelaje ya que al unirse Agouti a MCR-1, evita la activación de este receptor dependiente de la adenilciclase y desvía la síntesis de melanina hacia la formación de feomelanina (Carlson y cols., 2007).

1.3.2.2. Transferencia de melanosomas a los queratinocitos

Cada melanocito transfiere estos melanosomas, a través de sus dendritas (Aspengren y cols., 2009) a aproximadamente 30-40 queratinocitos de su alrededor, formando la denominada “unidad melanino-epidérmica” (Nordlund, 2007). Pese a que el melanocito se encuentra entre los queratinocitos de la capa basal, sus dendritas llegan hasta, al menos, la mitad del estrato espinoso (Figura 14).

Una vez dentro de los queratinocitos, los melanosomas tienden a situarse sobre el polo apical del núcleo de la célula, protegiéndola de los efectos de la radiación ultravioleta (Ando y cols., 2010). Además, aunque la presencia de melanina es mayor en los queratinocitos del compartimento basal de la epidermis, permanece en ellos durante su ascensión hacia las capas más superficiales de la epidermis. En sus últimas etapas, cuando los queratinocitos

llegan al estrato córneo de la piel, la mayor parte de los melanosomas desaparecen (Aspengren y cols., 2009).

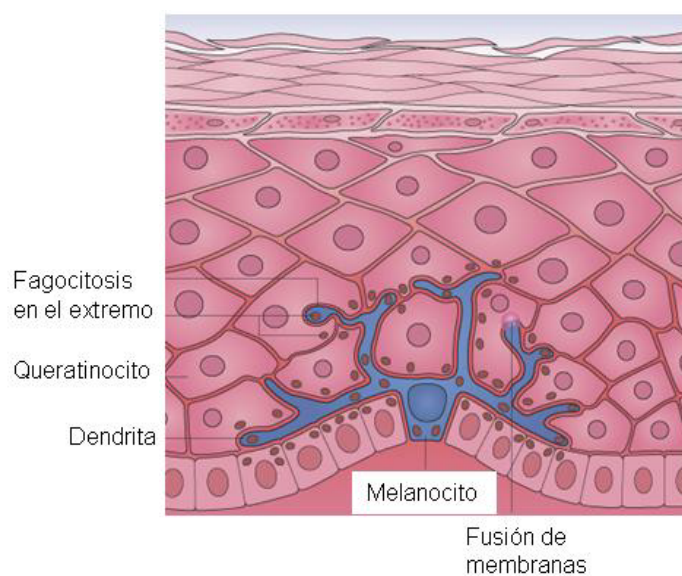


Figura 14: Unidad melanino-epidérmica. Modificado de Bologna y cols., 2004.

1.4. Pigmentación cutánea basal

1.4.1. Determinantes fenotípicos de la pigmentación cutánea basal

Así como en otras especies animales, los humanos presentan una gran variabilidad en el grado de pigmentación cutánea basal. El color de la piel es, en condiciones normales, el resultado de tres pigmentos: la melanina producida por los melanocitos, la hemoglobina de los hematíes en la vasculatura superficial, y en mucha menor medida, los carotenoides de la dieta (Rees, 2003). Sin embargo, las diferencias sistemáticas del color de la piel en el mundo se deben principalmente al **contenido de melanina de la piel**.

Estas variaciones no se relacionan con el número de melanocitos, que es muy similar en todas las razas (Tadokoro y cols., 2005), sino que están principalmente determinadas por el **número, localización, forma, tamaño y contenido** de los **melanosomas**, y por tanto, por la cantidad de melanina y la razón entre eumelanina y feomelanina (Rees, 2003). En las pieles claras, los melanosomas forman clusters rodeados de una membrana, mientras que en las pieles oscuras permanecen como gránulos aislados, y tienden a situarse todavía más sobre el polo apical del núcleo de la célula, protegiéndola de los efectos de la radiación ultravioleta (Sturm, 2006) (Figura 15).

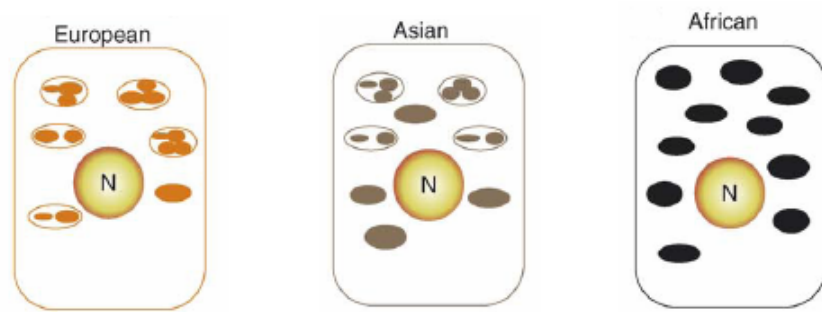


Figura 15: Distribución de los melanosomas según la etnia. Modificado de Sturm, 2006.

1.4.2. Determinantes genéticos de la pigmentación cutánea basal

La pigmentación cutánea basal es un **rasgo poligénico** y son muchos los loci que se han relacionado con ella en especies mamíferas, a través de la identificación de mutaciones naturales o inducidas artificialmente, que afectan a los niveles y tipos de melanina, o que dan lugar a patrones de pigmentación alterada por un aumento o disminución de los precursores implicados en la melanogénesis. Las **mutaciones** de algunos de estos genes causan una **ausencia total de melanina** como ocurre en el *albinismo oculocutáneo* (OCA 1,2,3 y 4) y otros síndromes relacionados, como el *síndrome de Hermansky-Pudlak*. Fue así como se intuyó inicialmente, que TYR, OCA2, TRP-1 y SLC45A2 serían genes relacionados con la pigmentación humana (pues su

ausencia provoca patologías que impiden la pigmentación normal de la piel), demostrándose, posteriormente, que determinados **polimorfismos** de estos genes, y de otros que se citarán, se asocian, efectivamente, a la **variación normal del color de la piel, el pelo y los ojos** (Sturm, 2009).

Para comprender la influencia de las variantes en los genes que determinan la pigmentación humana normal es necesario conocer la interrelación de las diferentes **vías implicadas en la síntesis, regulación y transporte** de la **melanina**, y por tanto, de los **melanosomas**, que se enumeran a continuación (Figura 16):

- **Complejo enzimático de la tirosinasa: TYR, TRP-1, TRP-2.** Proteínas localizadas en la membrana del melanosoma y responsables de la conversión del aminoácido tirosina en melanina.
- **Proteínas melanogénicas estructurales** importantes para la correcta melanogénesis: **MATP, NCKX5, proteína P, proteína OA1, Silver.**
- **Reguladores de la síntesis de melanina**, tanto hormonales, como receptores: **propiomelanocortina (POMC), alfa-MSH, ACTH, MCR1, proteína Agouti.**
- **Factores de transcripción** implicados en la producción de melanina: **MITF.**

- Proteínas implicadas en el transporte de los melanosomas: **MyosinVa, Rab27a** (Sturm y cols., 2001; Parra, 2007).
- Ligandos y receptores importantes en el control de la migración, proliferación y supervivencia de los melanocitos: **KITLG** (*ligand of KIT tyrosin kinase receptor*) y **KIT** (receptor) (Miller y cols., 2007).

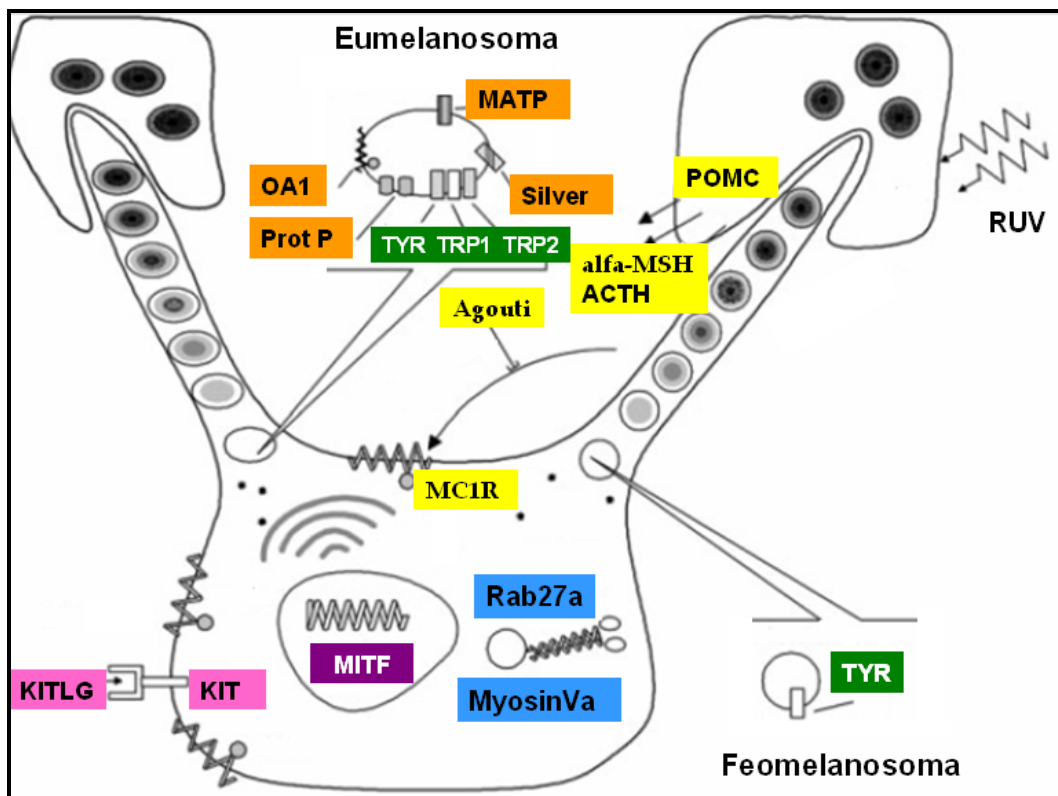


Figura 16: Representación esquemática de las vías implicadas en la regulación, síntesis y transporte de la melanina y los melanosomas. Elaboración propia tomando dibujo patrón de Parra, 2007.

De todas las proteínas que se relacionan con el proceso de melanogénesis (arriba enumeradas), aquellas cuyos genes presentan **polimorfismos que se han relacionado con la variación normal del color** de la piel, los ojos o el pelo, así como con la presencia de pecas o la sensibilidad al sol (Sturm, 2001; Sulem y cols., 2007; Sulem y cols., 2008; Parra, 2007; Sturm, 2009), se describen en la tabla 2:

Proteína	Gen	Cromosoma
SLC45A2	MATP	5
IRF4	IRF4	6
EXOC2	EXOC2	6
TYRP-1	TYRP-1	9
TYR	TYR	11
TPCN2	TPCN2	11
KILTG	KILTG	12
SLC24A4	SLC24A4	14
OCA2	P	15
SLC24A5	NCKX5	15
MCR1	MCR1	16
ASIP	Agouti	20

Tabla 2: Genes cuyos polimorfismos tienen influencia en la pigmentación cutánea basal y otros rasgos fenotípicos como el color de ojos, de pelo o el fototipo. Elaboración propia a partir de artículos: Sturm y cols., 2001; Sturm, 2006; Sulem, 2007; Parra, 2007; Sturm, 2009).

De todos los genes que aparecen en la tabla referida, los únicos cuyas proteínas no se han hecho referencia hasta el momento, son:

- **IRF4:** la proteína que codifica, IRF4 (interferon regulatory factor 4), es un importante factor de transcripción que regula la expresión génica en respuesta a interferones y otras citocinas (Han y cols., 2008).

- **EXOC2:** cromosoma 6, la proteína codificada por este gen, EXOC2, participa en el complejo exocítico, que es imprescindible para orientar las vesículas exocíticas hacia puntos concretos a través de la membrana plasmática (Han y cols., 2008).

- **TPCN2** (Two-pore channels): localizado en el cromosoma 11, codifica una proteína que actúa como canal transportador de calcio, similar a las proteínas codificadas por los genes SLC24A2 y SLC24A5. Sulem y cols., descubrieron una asociación estadísticamente significativa entre determinados polimorfismos localizados en este gen y la pigmentación humana (Sulem y cols., 2008).

Los **polimorfismos del gen MCR1** son los mayores responsables de la pigmentación cutánea y del fototipo. Se han identificado más de 70 variantes de MCR1 (García-Borrón y cols., 2005). Las variantes que implican una correcta funcionalidad del receptor inducen la formación de eumelanina, fuertemente fotoprotectora, y dan lugar a los fenotipos marrón/negro (Lynde y

Sapra, 2010). Aquellas variantes que determinan ***pelo rojo y piel clara***, son las que implican una alteración de la función normal del MCR1, desviando la síntesis de melanina hacia la formación de *feomelanina*, por dos motivos fundamentales:

- Por una ausencia o disminución de la función del MCR1.
- Por disminución de la afinidad del MCR1 por sus agonistas (Carlson y cols., 2007).

Recientemente se han identificado nuevas variantes de MCR1 por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que implican que MCR1, tras su síntesis en el retículo endoplasmático, quede retenido y no pueda movilizarse a la membrana del melanocito (Pérez-Oliva y cols., 2009).

Además, ya se han detectado polimorfismos de MCR1 que aumentan el riesgo de melanoma y que son independientes de la pigmentación y el fototipo cutáneo (Lynde y Sapra, 2010).

1.5. Factores de riesgo

En la tabla 3 se resumen los principales factores de riesgo relacionados con la aparición de melanoma, que se desarrollarán a continuación.

A. Factores de riesgo relacionados con el ambiente
1. Exposición solar
Exposición solar intermitente Quemaduras solares en la infancia Latitud ecuatorial Exposición a radiación ultravioleta
2. Exposición a agentes químicos
B. Fenotipo cutáneo
1. Etnia 2. Fototipoc cutáneo 3. Presencia de efélides 4. Color de pelo y ojos 5. Presencia de nevus: nevus melanocíticos comunes, nevus displásicos, síndrome del nevus displásico, nevus congénitos
C. Antecedentes
1. Familiares de melanoma o nevus displásicos 2. Familiares de otros cánceres 3. Personales de melanoma o de otros cánceres cutáneos
D. Factores de riesgo relacionados con el genotipo

Tabla 3: Factores de riesgo de padecer melanoma. Diseño propio.

1.5.1. Factores de riesgo relacionados con el ambiente

1.5.1.1. Exposición solar

La relación entre la exposición solar y el cáncer de piel se propuso por primera vez a principios del siglo pasado, cuando los médicos observaron que los tumores de piel crecían preferentemente en zonas de piel expuestas a la radiación solar.

Hoy día, la exposición de la piel a la radiación ultravioleta solar es considerada como la **principal causa del desarrollo del cáncer de piel**, por lo que se explicará de forma extensa en este apartado.

Se cree que al menos una parte del constante aumento de la incidencia de tumores cutáneos melanocíticos y no melanocíticos está relacionado con la exposición recreativa al sol. Los datos epidemiológicos indican que la exposición excesiva y acumulativa a lo largo años o décadas provocan la aparición de neoplasias malignas (Rass y Reichrath, 2008).

a) Exposición solar intermitente

En el desarrollo del melanoma están implicadas tanto la exposición solar crónica como las exposiciones agudas e intermitentes. No obstante, es la **exposición solar intermitente e intensa**, que produce quemaduras solares, la que tiene el mayor papel patogénico. Las dosis altas de radiación UV, que producen quemaduras solares, penetran hasta la base de la epidermis,

independientemente de la pigmentación del sujeto (Weinstock y cols., 1996). En el cáncer de piel no melanoma la exposición continua y crónica a la radiación UV daña parcialmente a los queratinocitos, pero no a los melanocitos. En las exposiciones intermitentes y agudas, el daño de los queratinocitos es tal que provoca apoptosis de los mismos, impidiendo su transformación neoplásica; sin embargo los melanocitos, que tienen menor tendencia a la apoptosis, sufren daños irreparables que provocarán la aparición de melanoma.

b) Quemaduras solares en la infancia

Pese a que la exposición solar en la edad adulta aumenta el riesgo de padecer melanoma, son las **quemaduras solares durante la niñez y la adolescencia** las que tienen mayor participación en la aparición posterior de melanoma. Tanto es así, que la preocupación por evitar la exposición solar en los niños se ha convertido en un problema de preocupación política, y ha llevado a la Unión Europea a elaborar recomendaciones de protección solar para los niños (Berneburg y Surber, 2009). Noonan y cols., pretendieron demostrar la mayor susceptibilidad de los niños, observada epidemiológicamente, mediante un modelo experimental, y encontraron una mayor aparición de melanoma en ratones transgénicos neonatales sometidos a radiación UV, que en ratones adultos. Las hipótesis propuestas son: 1) la piel neonatal tiene un número elevado de melanocitos inmaduros incapaces de reparar el daño, 2) la inmadurez del sistema inmune neonatal tolera los

antígenos melanocíticos generados por la exposición solar (Wolnicka-Glubisz y Noonan, 2006).

c) Latitud ecuatorial

En países con alta incidencia de melanoma como Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia, la tasa de melanoma en la raza blanca es mayor cuanto más cerca del ecuador (Berwick y Wiggins, 2006). Sin embargo, la incidencia de melanoma no se asocia ni con la latitud, ni con el grado de exposición a radiación ultravioleta en las personas de raza negra, en los de origen hispano o asiático, ni en los indios americanos (Eide y Weinstock, 2005).

d) Exposición a radiación ultravioleta

➤ Tipo de radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta representa alrededor del **5% de la radiación solar** que incide sobre la Tierra. Se divide fundamentalmente, de menor a mayor longitud de onda en (Figura 17):

- **UVC**: 200-290 nanómetros.
- **UVB**: 290-315 nanómetros.

- **UVA:** 315-400 nanómetros.

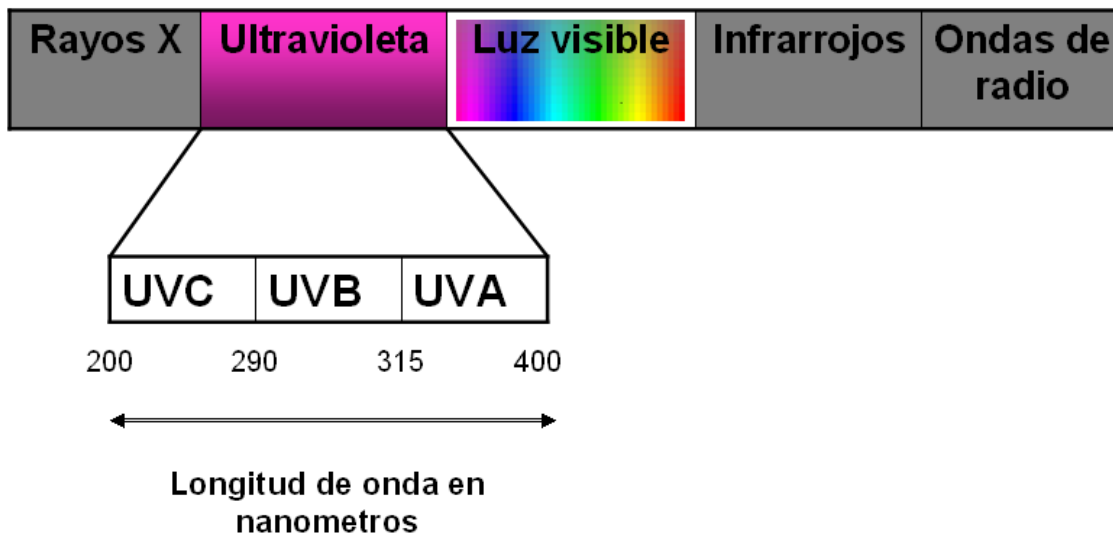


Figura 17: Espectro electromagnético ampliado a la región ultravioleta. Fuente: Diseño propio.

Las longitudes de onda más cortas son las de máxima energía y, por tanto, las que ejercen efectos letales en las células. Afortunadamente, el ozono de la estratosfera filtra completamente la UVC, que no llega hasta la superficie terrestre, y la mayor parte de UVB. De ahí la problemática actual por la disminución de la capa de ozono, que supondría un menor filtro para radiaciones dañinas de alta energía (Norval y cols., 2007).

En definitiva, de la radiación ultravioleta total que **llega a la superficie terrestre**, el **5% está formado por UVB**, y el **95% restante por UVA**. Las

pantallas solares protegen sobre todo de la radiación UVB, responsable de las quemaduras solares, al ser de menor longitud de onda y por tanto de mayor energía que la UVA. De hecho, el factor de protección solar (FPS) está referido a la protección frente a la UVB (Diffey, 2009). Por ello, dado que la mayor cantidad de radiación ultravioleta que alcanza la superficie de la tierra es UVA y no UVB, las industrias farmacéuticas intentan conseguir pantallas solares modernas que protejan de longitudes de onda superiores a los 320 nanómetros (UVA). Por lo general, cuanto mayor es el FPS (por encima de 45 o más), más probable es que se obtenga cierta protección añadida contra UVA (Wolff y cols., 2008).

Otra característica importante es que la **penetración de la radiación ultravioleta** es mayor cuanto mayor es la longitud de onda, y mientras el 70% de la radiación UVB es absorbida por los queratinocitos de los estratos superiores de la epidermis, la radiación UVA es absorbida entre el 70-80% por células de la dermis y los melanocitos de la epidermis basal (Cabrera Morales y López-Nevot, 2006) (Figura 18).

➤ **Efectos de la radiación ultravioleta**

La radiación ultravioleta incide en la melanización, proliferación y supervivencia de los melanocitos, tanto de forma:

- **Indirecta:** a través de su efecto sobre los queratinocitos, induciendo la síntesis y secreción de factores paracrinos.
- **Directa:** la radiación ultravioleta interacciona con cromóforos celulares (incluido el ADN), desencadenando reacciones biológicas que afectan a la proliferación, supervivencia y diferenciación de los melanocitos.

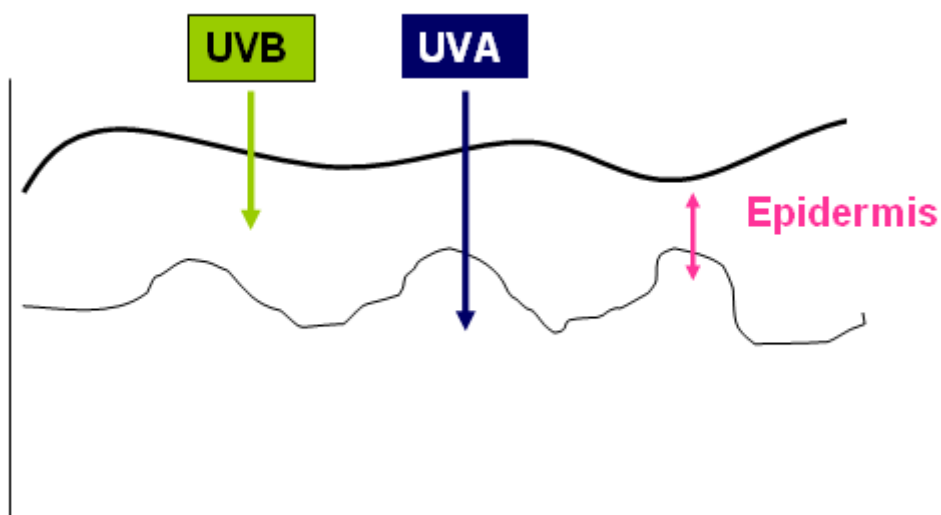


Figura 18: A mayor longitud de onda, mayor penetración cutánea. Fuente: Diseño propio.

Los **mecanismos de defensa** más importantes que protegen la piel humana contra la radiación UV son: la **síntesis de melanina** y los

mecanismos de reparación activos. El ADN es el principal objetivo de la radiación UV directa o indirecta, inducida por el daño celular. La baja capacidad de pigmentación en la raza blanca, la acumulación progresiva de daños que agotan los mecanismos de reparación del ADN y los defectos congénitos en la reparación de éste, son los principales responsables de los fracasos de protección (Rünger, 2008).

- **Síntesis de melanina:** *el bronceado como respuesta defensiva a la radiación ultravioleta*

El color de piel de cada persona en condiciones basales recibe el nombre de **pigmentación cutánea basal o constitutiva**. El aumento de esta pigmentación cutánea basal tras la exposición a radiación ultravioleta (bronceado) constituye la **pigmentación facultativa** de la piel que es un fenómeno defensivo frente a futuras exposiciones a radiación ultravioleta, que será absorbida, evitando así su interacción con otros componentes celulares que puedan ser dañados, y dando como resultado un efecto protector frente al fotoenvejecimiento y la carcinogénesis (Coelho y cols., 2009; Abdel-Malek y cols., 2008).

Bronceado inmediato: Es el oscurecimiento inmediato de la piel dentro de los 5-10 minutos de exposición y desaparece en minutos a días. Es provocado fundamentalmente por la radiación UVA y **no confiere fotoprotección**, ya que no se produce por un aumento de

melanina, sino por el reordenamiento de los melanosomas que se desplazan a las dendritas del melanocito (Wolber y cols., 2008).

Bronceado diferido: Se produce dentro de los 3-4 días de exposición UV, alcanza un pico entre los 10 días y las 3-4 semanas y va desapareciendo de manera gradual en varias semanas. Es provocado por la radiación UVA y UVB y **sí confiere fotoprotección** ya que, en términos generales, provoca un aumento de la melanina epidérmica total (Coelho y cols., 2009).

La capacidad de broncearse con la exposición solar está en parte determinada por la pigmentación basal del individuo, y es muy variable entre los sujetos, siendo importante en este punto el papel de MCR1, como ya se ha comentado en apartados previos. La exposición a radiación UV produce un incremento en la síntesis de ACTH y α -MSH, que se traduce en la activación de MCR1 y en consecuencia, las vías de señalización que inducen el bronceado. Se están diseñando análogos de la α -MSH como estrategia para prevenir el cáncer de piel en individuos que expresan genotipos poco funcionantes de MCR1 (Abdel-Malek y cols., 2008).

- **Mecanismos de reparación activos:** radiación ultravioleta y fotocarcinogénesis.

Como consecuencia de una exposición repetida y continuada a la radiación ultravioleta ocurren modificaciones en el ADN que de forma natural son reparadas por los mecanismos celulares de escisión de nucleótidos (**NER, *nucleotide-excision repair***) y de escisión de bases (**BER, *base-excision repair***). El efecto acumulativo de modificaciones no reparadas puede desencadenar la aparición de mutaciones puntuales en genes diana como el gen supresor de tumores p53 (Hoeijmakers, 2001).

Clásicamente se pensaba que la radiación UVB era la única que producía daños directamente en el ADN, mientras que la radiación UVA provocaba estos daños de forma indirecta, mediante la formación previa de especies reactivas del oxígeno y radicales libres, que eran los realmente dañinos para el ADN (Enninga y cols., 1986).

Hoy día se considera que ambos tipos de radiaciones, **UVA y UVB, son capaces de incidir directamente sobre el ADN** y provocar daños en el mismo (Rünger y Kappes, 2008; Rünger, 2008; von Thaler y cols., 2010) (Figura 19).

La importancia del mantenimiento de la integridad del genoma por parte de los sistemas de reparación del ADN ante los agentes genotóxicos, como la radiación UV, es puesta de manifiesto por la alta incidencia de tumores de piel que presentan los pacientes afectados por

síndromes con defectos en el sistema de reparación de escisión de nucleótidos (NER), como en el caso del xeroderma pigmentosum, en el síndrome de Cockayne, y en la tricodistrofia. En estos síndromes, numerosas lesiones producidas por la radiación UV no reparadas, dan lugar a la aparición de mutaciones en genes clave, que posteriormente desencadenan tumores de piel (melanoma y no melanoma) (Lehmann, 2003).

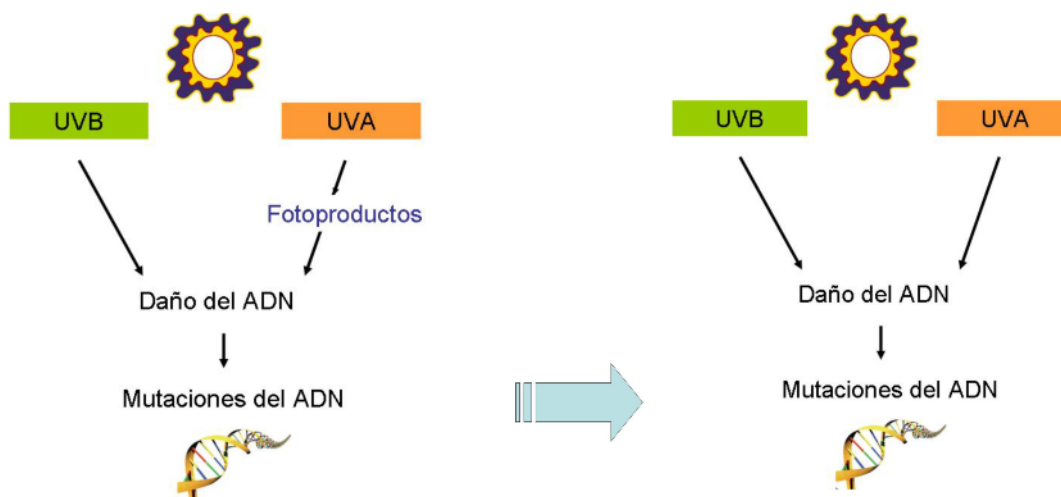


Figura 19: Recientemente se ha demostrado que las radiaciones UVA pueden inducir daño del ADN directamente, sin necesidad de generar fotoproductos como intermediarios. Diseño propio.

Fotoproductos del ADN

La primera etapa en la carcinogénesis inducida por la luz solar ocurre cuando los fotones de la radiación ultravioleta inducen la formación de fotoproductos del ADN. Esto ocurre cuando las pirimidinas timina o citosina absorben radiación UV alcanzando un estado excitado que conduce a la formación de un enlace covalente con una timina o una citosina adyacente (Figura 20), lo que forma una estructura anular de cuatro miembros, denominada **dímero de ciclobutilpirimidina (CPD)** si se producen enlaces 5-5 y 6-6, o bien **fotoproductos de 6-4 pirimidina-pirimidona** si aparece un solo enlace entre la posición 6 de una pirimidina y el grupo exocíclico de la otra (Figura 21).

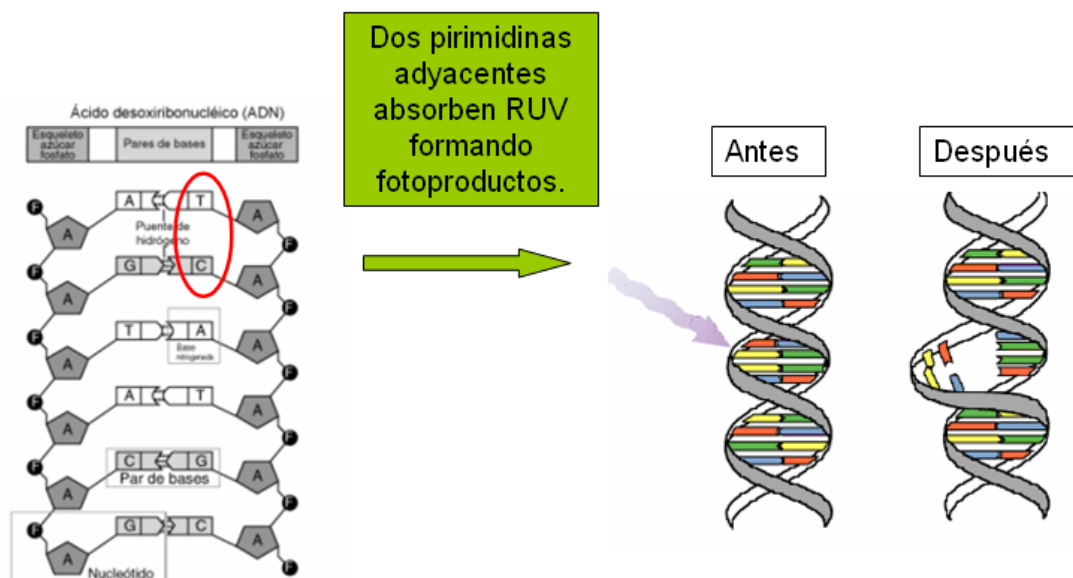


Figura 20: Formación de fotoproductos por radiación UV. Elaboración propia a partir de fragmentos de Alberts y cols., 2004.

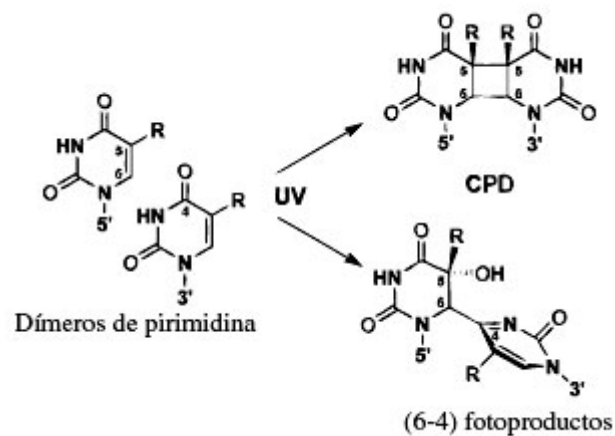


Figura 21: Fotoproductos del ADN por radiación UV. Fuente: Modificado de <http://www.scielo.cl/fbpe/img/idesia/v27n3/fig09-01.jpg>.

Estas lesiones únicas igualmente dan lugar a mutaciones únicas en el ADN. La radiación ultravioleta induce predominantemente transiciones C→T y CC→TT en las secuencias de dímeros de pirimidina, constituyendo la característica más destacada de la mutagénesis inducida por la radiación UV (Pfeifer y cols., 2005). Se piensa que ambas mutaciones se originan durante la replicación semiconservativa del ADN, cuando la ADN polimerasa llega a una lesión de dímero de pirimidina y no sabe interpretar qué base complementaria debe de insertar, con lo cual la enzima, por defecto, introduce una adenina. Por lo tanto los dímeros C→C pueden originar mutaciones del tipo C→T o bien CC→TT, ya que la ADN polimerasa inserta una A frente a una C de la hebra o cadena complementaria. Posteriormente, durante la replicación semi-

conservativa del ADN se insertan residuos de T en la hebra recién sintetizada dando lugar a la aparición de la mutación (Brash y cols, 1991). Otras mutaciones inducidas por radiación UV, aunque menos frecuentes, son las que pueden cambiar C→A y G→T, y las roturas de las hebras de ADN (Wikonkal y Brash, 1999).

A pesar de la correlación epidemiológica existente entre melanoma y luz solar, los genes con mutaciones distintivas por radiación UV no son prevalentes y se conoce mucho menos la relación molecular entre el daño por radiación UV y melanoma, a diferencia de lo que ocurre con la bien conocida relación entre daño por radiación UV y cáncer de piel no melanoma. En el melanoma maligno únicamente aparece un 10% de mutaciones en el gen p53 (Zerp y cols., 1999), a diferencia de los carcinomas basocelulares y espinocelulares con más del 60% de mutaciones en p53 (Giglia-Mari y Sarasin, 2003). Estos datos sugieren que existe una vía independiente de p53 implicada en el desarrollo tumoral del melanoma. De hecho, en el melanoma se ha obtenido evidencia de mutaciones por radiación UV en la vía p16 (INK4a/ retinoblastoma). El gen CDKN2A codifica dos proteínas supresoras de tumores distintas (p16/INK4a y p14/ARF) que afecta a las vías del retinoblastoma y p53, respectivamente (Sarkar-Agrawal y cols., 2004).

➤ **Fuentes artificiales de UV**

Existen controversias respecto al papel de las lámparas de bronceado o cabinas UVA en el desarrollo de los melanomas, si bien ésta parece clara en los carcinomas.

Aunque la exposición a la radiación ultravioleta es un factor importante, al que se le debe prestar atención ya que se puede modificar, debemos considerar que por sí mismo no es un factor suficiente para la aparición de melanoma, pues este tumor en ocasiones afecta a zonas anatómicas en principio fotoprotegidas, como las plantas de los pies y las mucosas (Wolff y cols., 2008).

1.5.1.2. Exposición a agentes químicos

Algunos estudios han planteado la posibilidad de que la exposición ambiental u ocupacional a agentes químicos específicos pueda tener relación con la aparición de melanoma, pero hasta la fecha la evidencia no es concluyente ya que los trabajos que abordan esta asociación suelen ser estudios ecológicos o estudios observacionales de carácter ocupacional.

Entre los productos químicos citados en la bibliografía se encuentran:

- **Bifenilos policlorados**: usados por electricistas, trabajadores de telecomunicaciones o empleados de mantenimiento (Langseth y Andersen, 2000).
- **Arsénico**: es un reconocido carcinógeno cutáneo, asociado con cáncer de piel no melanoma. Sin embargo, existen algunos trabajos que también lo relacionan con melanoma (Kennedy y cols., 2005).
- **Pesticidas, derivados del petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos** (Settimi y cols., 1999).

Hay que tener presente que la mayoría de estas asociaciones son poco consistentes y de momento no han pasado del plano especulativo.

1.5.2. Fenotipo cutáneo

Existen características fenotípicas que se han asociado con un mayor riesgo de presentar melanoma, como la variabilidad étnica, el fototipo cutáneo, la presencia de pecas y el color de pelo y ojos.

1.5.2.1. Etnia

En función de la raza, existe un riesgo diferente de presentar melanoma, debido a las variaciones fenotípicas raciales, sobre todo por la **pigmentación basal de la piel**, pues ello se traduce en diferente eficacia a la hora de proteger la piel de los rayos solares, y por ello, la incidencia de melanoma en sujetos de piel clara es mucho mayor que en sujetos de pieles oscuras (Cormier y cols., 2006). Cuanto más oscura sea la piel, más cantidad de eumelanina que es la melanina más fotoprotectora.

1.5.2.2. Fototipo cutáneo

El fototipo cutáneo define la tendencia que tiene la piel de los sujetos a quemarse con la exposición solar y la capacidad de broncearse con la misma. Una de las clasificaciones más usada es la de Fitzpatrick (Fitzpatrick, 1988).

La clasificación por fototipos se definió originariamente para adecuar la dosis de rayos UVA y psolarenos necesarios en sujetos con psoriasis, y se basa en la información que daban los sujetos sobre su respuesta inicial ante la exposición solar, determinada en gran medida por la pigmentación basal de la piel (Kadekaro y cols., 2003b).

Fototipo	Quemadura solar	Bronceado	Fenotipo
I	Con facilidad	Nunca	Piel muy blanca, de tipo céltico
II	Con facilidad	Mínimo	Piel muy blanca que tras mucha exposición solar adquiere ligero tono café con leche
III	Con cierta facilidad	Sí	Con las primeras exposiciones solares se producen quemaduras pero en cuestión de una o dos semanas se adquiere un bronceado completo
IV	Requiere exposición intensa y mantenida	Con facilidad	Junto con el fototipo III representan la mayoría de la población mediterránea. Similar al III aunque el bronceado se adquiere en unos pocos días
V	Exposición muy intensa	Muy fácilmente	Tono oscuro natural. Piel de los indígenas americanos
VI	Nunca	Siempre	Raza negra

Tabla 4. Clasificación de Fitzpatrick del fototipo cutáneo. Fuente: Fitzpatrick, 1988.

Las personas de piel clara, con fototipos I y II, presentan un mayor riesgo de desarrollar melanoma. Como se ha comentado anteriormente, esto se debe a que el color de la piel depende, en gran medida, de diferentes **polimorfismos** en el gen del receptor de la melanocortina (MCR1), de forma que las personas de piel clara y, sobre todo los pelirrojos, presentan una mayor cantidad de feomelanina, que tiene menor capacidad protectora frente a la radiación ultravioleta (Pho y Leachman, 2010).

1.5.2.3. Presencia de efélides

Las efélides son máculas pigmentadas que pueden aparecer en cualquier lugar del cuerpo. Aparecen por un aumento del tamaño de los melanocitos en la capa basal, con hiperpigmentación de la epidermis, pero sin incremento en el número de melanocitos. Son más frecuentes en pieles claras, y se asocian a la exposición solar, pudiendo incluso llegar a desaparecer totalmente durante el invierno. Parece ser, que hasta un 91% de la variabilidad en el número total de pecas podría atribuirse a causas genéticas (Bataille y cols., 2000). Se cree que el principal gen que codifica para MCR1 también está relacionado con este fenotipo, y el número de zonas del cuerpo, en el que se encuentran las pecas, se asocia con la presencia de variantes de este gen (Gandini y cols., 2005b).

1.5.2.4. Color de ojos y pelo

Hoy por hoy, no se conoce ningún papel fisiológico del color del pelo o de los ojos, a diferencia de lo que ocurre con la pigmentación de la piel. La mayoría de las variaciones de color de pelo e iris se dan en personas de ascendencia caucásica (Parra, 2007).

El color de ojos es un rasgo poligénico, con variaciones cromáticas que van desde marrón muy oscuro hasta tonos muy claros de azul. La variación del color se debe a la cantidad de melanina y al número de melanosomas en la cara anterior del iris (Kayser y cols., 2008).

La variabilidad en el color de los ojos en los europeos se debe en gran medida a polimorfismos en OCA2, uno de los genes implicados en la pigmentación cutánea (Duffy y cols., 2004). Y, recientemente, se ha encontrado un nuevo gen, *HERC2*, situado en el mismo cromosoma y muy cerca de OCA2, cuyas variantes también se asocian a las diferencias en coloración del iris en personas de ancestros europeos (Kayser y cols., 2008; Sturm y cols., 2008; Sulem y cols., 2007). Existe pues, un mayor riesgo de tener melanoma cutáneo en los individuos con ojos claros (Gandini y cols., 2005b).

Con respecto al **color del cabello**, se han descrito desde hace mucho tiempo, diferencias de riesgo de tener melanoma en los individuos con cabellos claros. En la última década se ha investigado especialmente el claro exceso de

riesgo que se suele encontrar en los sujetos pelirrojos, que generalmente tienen además piel muy fotosensible (Gandini y cols., 2005b).

Sin embargo, estos factores no pueden contemplarse de manera aislada, ya que parece que muchos de los rasgos fenotípicos mencionados como factores de riesgo para melanoma no se comportan de forma independiente. Duffy y cols. estudiaron la relación entre color de pelo, color de ojos, presencia de pecas y lunares, combinando, además estos datos con información genética sobre polimorfismos en MCR1 y en OCA2 (Duffy y cols., 2004). Sus resultados, como refleja gráficamente la figura 22, muestran la gran interrelación que existe entre estas características.

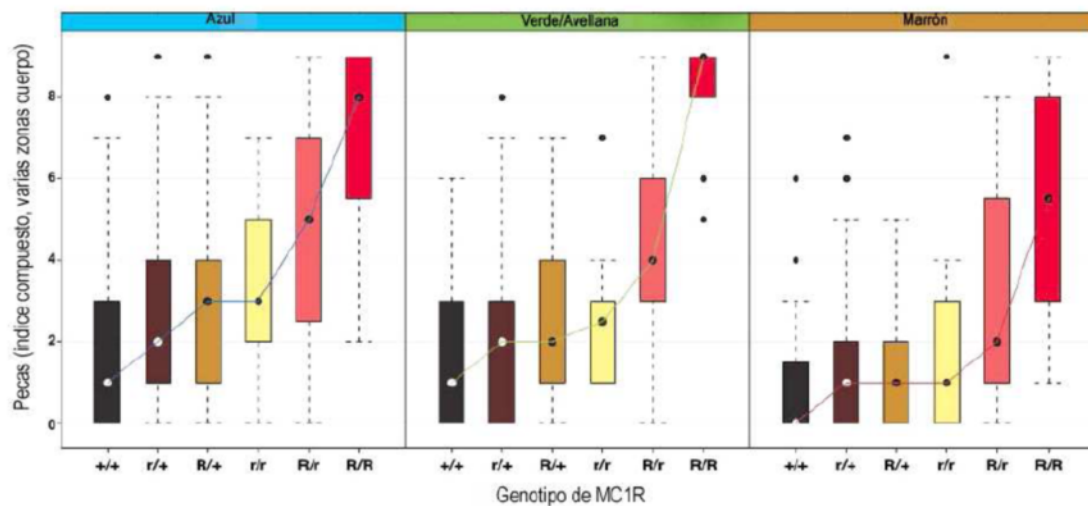


Figura 22: Relación entre color de ojos, color de pelo, presencia de pecas y variantes de MCR1. Los colores de las barras indican la tonalidad del cabello.

Fuente: Duffy y cols., 2004.

Más recientemente, Sulem y cols. han comprobado, en un análisis de asociación del genoma completo que, además de estos dos genes, hay otros que también explican parte de la variabilidad en estos rasgos y la frecuente combinación de los mismos. Es el caso de determinados polimorfismos en genes ya comentados al hablar de la pigmentación cutánea, como el gen *TYR*, *KITLG* o *SCL24A4* (Figura 23).

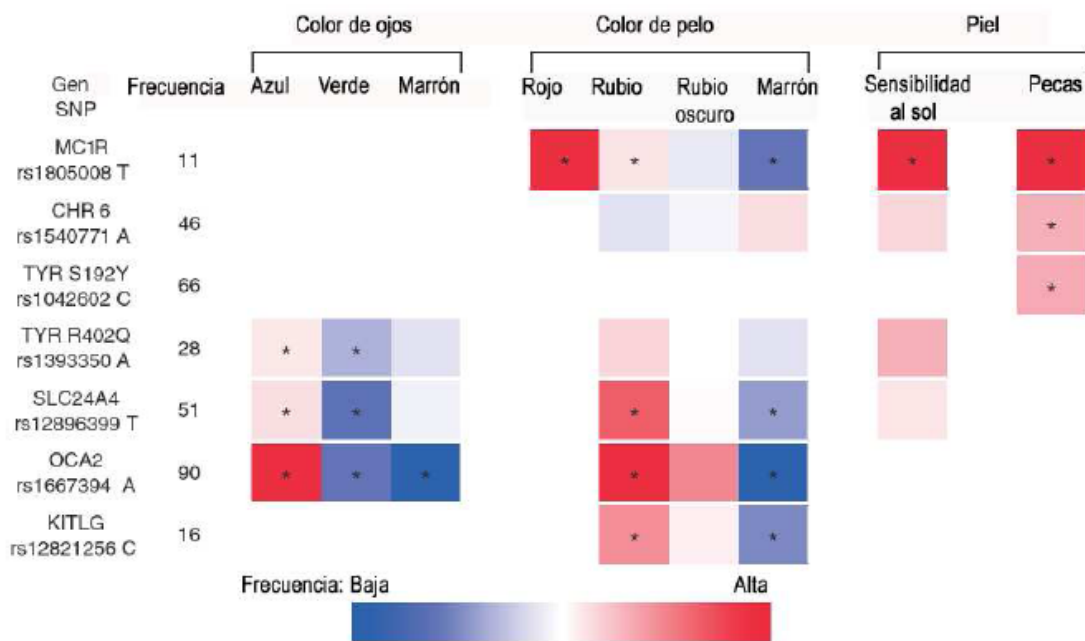


Figura 23: Genes relacionados con el color de ojos, color de pelo, pecas y sensibilidad al sol. Asociaciones significativas en análisis con genoma completo. Fuente: Sulem y cols., 2007.

Es quizá poco adecuado hoy en día, estudiar los riesgos asociados a las características fenotípicas sin abordar cuáles son los orígenes de las mismas y cuál es el mecanismo biológico que sustenta su posible relación con el melanoma. La investigación sobre asociación de melanoma y características fenotípicas, por tanto, está pasando a integrarse dentro de la búsqueda de genes de susceptibilidad que modulan la respuesta de los sujetos frente a los agentes dañinos, modificando la probabilidad de desarrollar este tumor.

1.5.2.5. Presencia de nevus

La relación entre nevus y melanoma es controvertida, pues aunque los nevus pueden ser lesiones precursoras de melanoma, **cerca del 80% de los melanomas aparecen “de novo”** (Massi y cols., 1999). Por ello, hay autores que sostienen que, más que lesiones precursoras, los **nevus** son, sobre todo, un marcador que refleja la susceptibilidad del sujeto ante la exposición solar (Armstrong y Kricger, 1996), y por tanto, una **mayor susceptibilidad a desarrollar melanoma** (Bataille y cols., 2000).

a) Nevus melanocíticos comunes

La presencia de un número elevado de nevus es un marcador de riesgo de padecer melanoma, de tal manera que la presencia de **más de 50 nevus**

adquiridos de más de 2 mm conlleva un riesgo relativo de 3 respecto a tener menos de 15. Cuando los nevos son más de 100, dicho riesgo se eleva a casi 7 (Gandini y cols., 2005a). Parece que el riesgo asociado a los nevos está condicionado porque el número de nevos depende de una predisposición genética para el desarrollo de lesiones melanocíticas (Whiteman y cols., 2005) y de las exposiciones intermitentes al sol durante la infancia (Stierner y cols., 1992).

Los nevos aparecen de forma progresiva a partir de los primeros 6-12 meses de vida (sólo un 1-2% de los recién nacidos de raza caucásica tienen lunares). La velocidad de aparición y el número de nevos están modulados por la exposición ambiental al sol en los niños, y al número de lunares de sus progenitores (Bauer y cols., 2005).

A partir de los 30-40 años se produce una caída en el número de nevos (Bataille y cols., 1996), aunque algunos autores consideran que este descenso es posterior, en torno a los 50 años (Krüger y cols., 1992). Se ha apuntado que el proceso de maduración y desaparición de los nevos puede corresponder con el final de la proliferación de los melanocitos y la inducción de la senescencia celular, y que, por tanto, alteraciones en el mismo podrían jugar un papel relevante en el proceso de aparición del melanoma (Wachsmuth y cols., 2001). Evidencias recientes muestran que las células de los nevos sufren un proceso de senescencia o envejecimiento biológico inducido por oncogenes implicados en la vía de p16/ retinoblastoma (Bataille y cols., 2007).

b) Nevus displásicos

Nevus displásico es aquel que presenta algún componente maculoso en su área y, además, tres de los siguientes criterios: contorno mal definido, tamaño mayor o igual a 5 mm, color variado, contorno irregular y presencia de eritema. La presencia de nevus atípicos suponen un incremento de riesgo de tener melanoma independiente de la historia familiar (Gandini y cols., 2005b) y del número de lunares (Gruber y Armstrong, 2006).

c) Síndrome del nevus displásico

Este síndrome está basado clínicamente en cuatro criterios, de los que deben estar presentes al menos tres (Newton Bishop y cols., 1994) (Tabla 5).

Síndrome del nevus displásico		
Deben estar presentes 3 de los siguientes	Presentar más de 100 nevus en sujetos entre 20 y 50 años, o por encima de 50 nevus si es mayor de 50 años	Tener más de un nevus en las nalgas o en el dorso del pie
	Tener más de un nevus atípico	Presentar nevus en la cara anterior del cuero cabelludo

Tabla 5. Definición de síndrome de nevus displásico. Elaboración propia.

El **síndrome del nevus displásico** puede presentarse:

- **De forma esporádica**

- **Con agregación familiar:** denominado síndrome del nevus displásico familiar, “**B-K mole síndrome**”, en referencia a la primera inicial de los apellidos de las dos familias en las que fue descrito este síndrome, o síndrome FAMMM (familial atypical mole-malignant melanoma). En estas familias, la susceptibilidad a melanoma y a nevus displásicos parece tener un patrón de herencia autosómica dominante, de penetrancia y expresividad variable (Gruber y Armstrong, 2006).

El riesgo de desarrollar un melanoma a lo largo de la vida en los pacientes afectados es muy elevado; sin embargo, los pacientes no afectados de las mismas familias no presentan un aumento de riesgo (Gruber y Armstrong, 2006).

d) Nevus congénitos

Los nevus congénitos grandes son posibles precursores reconocidos de melanoma, aunque el grado de riesgo varía **en función del tamaño del nevus**. El riesgo de presentar un melanoma sobre un nevus melanocítico congénito **grande (>20 cm)** durante la vida es del orden de 5-10%, teniendo en cuenta,

que el 70% de estos melanomas aparecen antes de los 10 años de edad. En los nevos congénitos pequeños o medianos, el riesgo de melanoma es similar al de cualquier otra zona de la piel (Krengel y cols., 2006).

1.5.3. Antecedentes

a) Familiares de melanoma o nevus displásicos

Se estima que los pacientes con melanoma familiar representan del 10 al 15% de los casos de melanoma. Tener un familiar directo con melanoma duplica el riesgo de este tumor, mientras que tener tres o más, lo aumenta de 35 a 70 veces (Wolff y cols., 2008). Parte de este riesgo se puede atribuir a factores de riesgo compartidos, como fenotipo cutáneo, múltiples nevus, excesiva exposición al sol y alteraciones genéticas familiares. En relación con esto, se han encontrado mutaciones germinales en el gen supresor CDKN2A (que codifica para p14 y p16) en el 20% de las familias estudiadas, y en el 50% de los casos ligados a la región 9p21 (Pho y cols., 2006).

b) Familiares de otros cánceres

Aunque aún no se ha determinado de forma definitiva, parece ser que los antecedentes de cáncer de páncreas y mama en familiares de primer grado podrían representar un factor de riesgo de padecer melanoma. Las familias con mutaciones germinales en el gen CDKN2A presentan incremento del riesgo de desarrollar melanoma y cáncer de páncreas (Goggins y cols., 2004; Rulyak y cols., 2003).

c) Personales de melanoma o de otros cánceres cutáneos

Tener un melanoma confiere un mayor riesgo que el de la población general de desarrollar otro melanoma. Este riesgo hace que un 3-6% de los pacientes tengan un segundo melanoma a lo largo de su vida. Se han encontrado mutaciones en el gen supresor CDKN2A en pacientes con melanomas múltiples, lo que demuestra la existencia de una cierta susceptibilidad genética, además de la presencia de otros factores ambientales. Esto justifica la necesidad de hacer un seguimiento cutáneo de por vida a los pacientes con melanoma, independientemente del pronóstico. Se ha demostrado que esta actitud condiciona que los siguientes melanomas se detecten en fases precoces con espesores muy bajos.

La presencia de otros cánceres cutáneos, que se considera indicativa de un daño actínico, confiere un riesgo de 4,28 respecto a su ausencia (Asin y cols., 2006).

1.5.4 Factores de riesgo relacionados con el genotipo

Como se ha citado, el melanoma es una enfermedad poligénica multifactorial en la que intervienen factores ambientales que actúan sobre una **predisposición o susceptibilidad genética heredada**.

La predisposición genética a padecer la enfermedad se explica en gran medida por la existencia de **mutaciones germinales**, que se transmiten de generación en generación, a diferencia de las mutaciones somáticas, que se adquieren con posterioridad al nacimiento y no se heredan. Así pues, un **5-10%** de los casos de melanoma se desarrollan en familias con **melanoma familiar**. Estas familias pueden ser portadoras de mutaciones germinales poco prevalentes en la población general, pero de alta susceptibilidad a melanoma en **genes de alta penetrancia**. Pero la susceptibilidad genética a desarrollar melanoma muy probablemente también está presente en los **melanomas esporádicos** y estaría determinada por mutaciones o polimorfismos germinales muy frecuentes en la población general en **genes de baja penetrancia**. En los últimos 20 años se han realizado múltiples estudios epidemiológicos, de ligamiento y de asociación, con la finalidad de conocer la base genética de susceptibilidad a esta neoplasia.

1.5.4.1. Genes de alta penetrancia

En el melanoma familiar se ha demostrado la existencia de un patrón de herencia **autosómica dominante con penetrancia incompleta**. Esta susceptibilidad a melanoma se expresa con la presencia de múltiples casos de melanomas en familiares de primer o segundo grado, habitualmente asociado a múltiples nevus o nevus displásicos. Mediante estudios citogenéticos, moleculares y de ligamiento se han identificado los dos genes de alta penetrancia más importantes en este sentido: **CDKN2A (9p21)** y **CDK4 (12q14)** (Hocker y cols., 2008; Thompson y cols., 2009).

Para entender la participación de estos genes como reguladores de la proliferación celular melanocitaria, es de ayuda recordar las fases del ciclo celular (Figura 24).

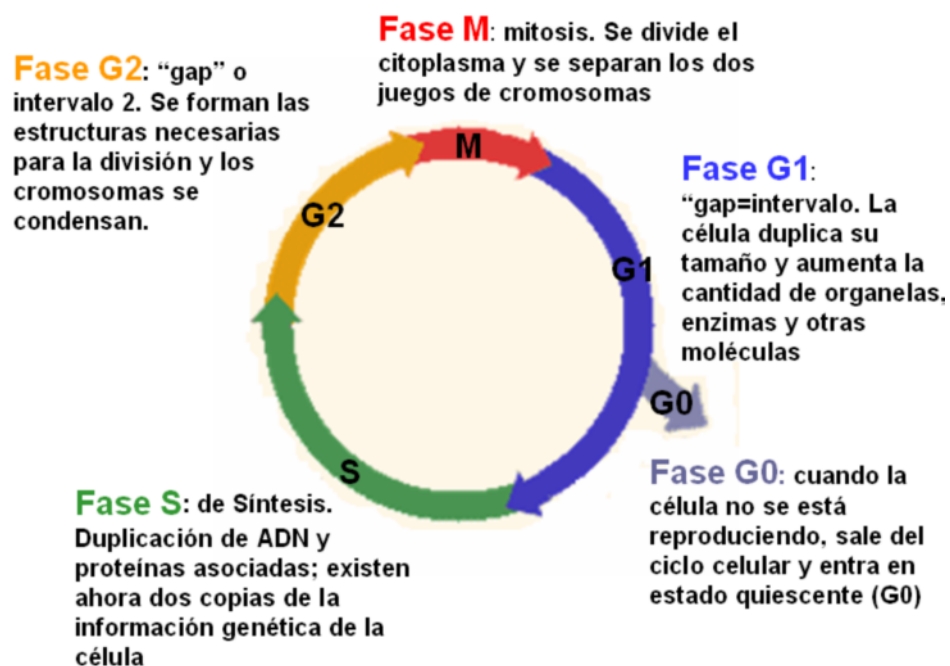


Figura 24: Fases del ciclo celular. Diseño propio.

a) CDKN2A

El gen *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) fue localizado en el cromosoma 9p21 por primera vez en 1994 (Hussussian y cols., 1994) (Figura 25).

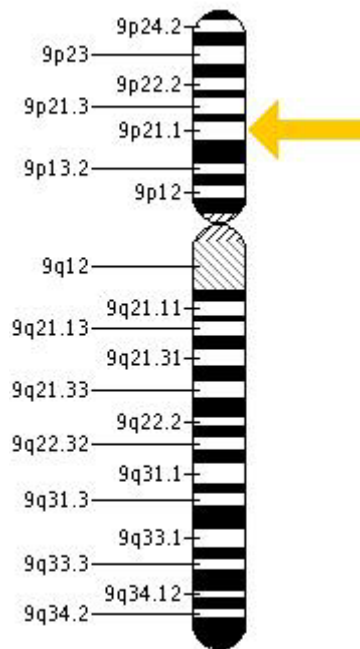


Figura 25: Localización del locus *CDKN2A* en el cromosoma 9. Fuente: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDKN2A>.

Está formado por 4 exones y codifica dos proteínas que son transcritas en diferentes pautas de lectura:

- La **transcripción alfa**, que comprende los exones 1 alfa, 2 y 3, codifica para p16 y actúa mediante su unión a la cinasa dependiente de la

ciclina CDK4 y CDK6 (por lo que también se denomina INK4a -inhibidor de la cinasa 4a- o **p16^{INK4A}**), inhibiendo su asociación con la ciclina D1 y evitando la formación del complejo CDK/ciclina D1. Este complejo fosforila e inactiva la proteína del retinoblastoma (pRb) y permite a la célula melanocítica la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S. La pRb es una proteína supresora de tumores que actúa inhibiendo la progresión del ciclo celular, y por tanto la proliferación celular. Si INK4A no funciona correctamente, el ciclo celular no se detiene y la célula se multiplica sin control (Sekulic y cols., 2008) (Figura 26).

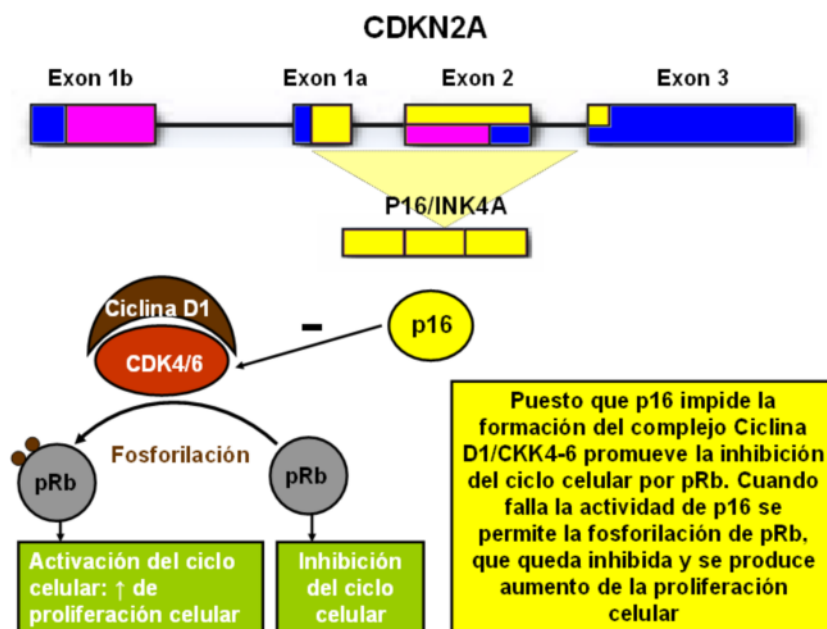


Figura 26: Vía p16^{INK4A}. Diseño propio.

- La **transcripción beta**, que comprende el exón 1 beta y el exón 2, codifica para la proteína **p14^{ARF}** (Alternative Reading Frame). Esta proteína regula la función de p53 y la proteína del retinoblastoma uniéndose e inhibiendo la función de HDM2 (lo que impide la degradación de p53 por la ubiquitina) y, por tanto, favoreciendo la apoptosis y bloqueando la transformación de los melanocitos en células malignas (Nelson y Tsao, 2009) (Figura 27).

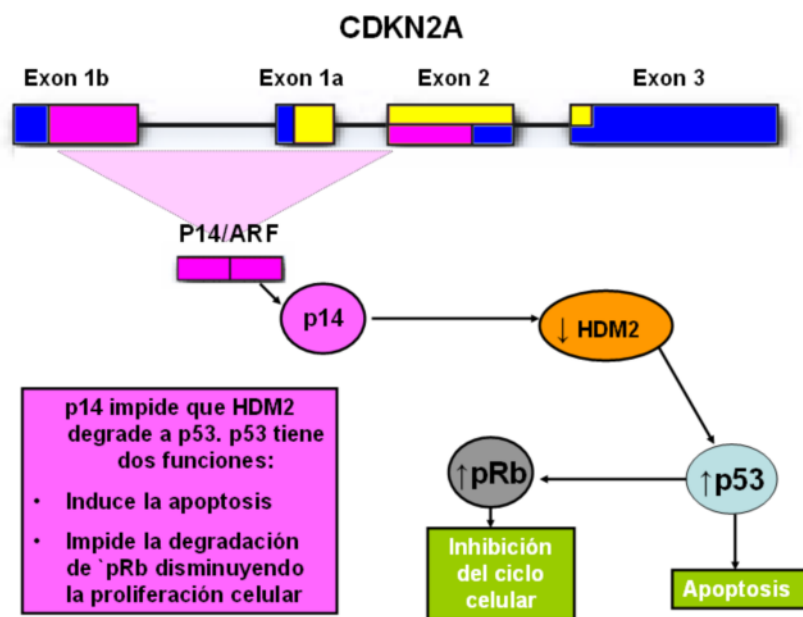


Figura 27: Vía p14/ARF. Diseño propio.

El estudio más extenso de la implicación de CDKN2A en el melanoma familiar se llevó a cabo por el Consorcio de Genética del Melanoma

(**GenoMEL**), que comprende alrededor de 20 centros de Europa, Australia, América del Norte y Oriente Medio. En un informe de este Consorcio (Goldstein y cols., 2006), el análisis de CDKN2A fue realizado en 466 familias de alto riesgo (con tres o más pacientes con melanoma -un total de 2.137 pacientes con melanoma-). Se concluyó que aproximadamente el **40%** de dichas familias son portadoras de mutaciones en CDKN2A (cambios de una sola base, pequeñas inserciones y deleciones o, raramente, deleciones importantes) (Meyle y Guldberg, 2009). Sin embargo, las mutaciones germinales de CDKN2A están presentes sólo entre un 0,2 y un 2% de los casos esporádicos (Chin, 2003) y en un 0,01% de la población general (Bishop y cols., 2002).

En los múltiples estudios realizados, la mayoría de las mutaciones se encuentra en los exones 1 alfa (Australia) y 2 (Europa), aunque también se han encontrado mutaciones que tan sólo afectan al exón 1 beta (Rizos y cols., 2001). No obstante, no existe una correlación exacta entre el exón mutado y el producto transcrito afectado, esto es, entre genotipo y fenotipo (por ejemplo una mutación del exón 2 no siempre conlleva una alteración de p16/IN4A y de p14/ARF, sino que puede afectar solo a uno u otro). El hecho de que el fenotipo no se correlacione con el tipo de mutación o el lugar dentro del gen donde ocurra, pondría de manifiesto la importancia de los genes modificadores, así como del ambiente, en el desarrollo y la progresión del cáncer (Bishop y cols., 2002). El grado de penetrancia de estas mutaciones para el desarrollo de melanoma ha sido estimado en 0,30 (IC 95 %: 0,12-0,62) a los 50 años de edad, y de 0,67 (IC 95 %: 0,31-0,96) a los 80 años de edad, es decir, la

probabilidad de padecer la enfermedad en los sujetos con mutaciones germinales en *CDKN2A* ronda el 30% y el 67% a los 50 y 80 años, respectivamente. También el grado de penetrancia de estas mutaciones es distinto en función del país de procedencia, existiendo una mayor probabilidad de desarrollar melanoma en Australia que en Estados Unidos o Europa (Piepkorn y cols., 2000). Ésto podría ser debido también a la exposición ambiental o a otras mutaciones genéticas concomitantes.

La diversidad de mutaciones en este gen es elevada, a pesar de poseer una secuencia no muy larga. Se han descrito más de 150 mutaciones germinales, de las cuales al menos 10 de ellas se presentan en un alto porcentaje (Puig y cols., 2005).

Por último, parece ser que existe una elevación del riesgo de padecer **cáncer de páncreas** en las familias portadoras de mutaciones germinales de *CDKN2A*. En el estudio GenoMEL, el 28% de las familias con mutación de *CDKN2A* presentaba al menos un caso de cáncer de páncreas, en contraste con la presencia de este cáncer en sólo el 6% de las familias que presentaban *CDKN2A* no mutado (Goldstein y cols., 2006).

b) CDK4

Las mutaciones germinales de *CDK4* -kinasa ciclina-dependiente 4- (locus 12q14) son raras en comparación con las de *CDKN2A*. Solo el 2% de las

familias estudiadas en GenoMEL eran portadoras de mutaciones en CDK4 (Goldstein y cols., 2006), y en todo el mundo han sido reportadas menos de 15 familias (Pjanova y cols., 2009).

Las mutaciones en CDK4 parecen estar asociadas al mismo patrón de herencia y al mismo riesgo atribuible de melanoma que las mutaciones del gen CDKN2A, pero la frecuencia de las mutaciones es tan baja que se necesitarán estudios poblacionales más extensos para poder aseverar estas afirmaciones.

Solo se han detectado 2 mutaciones germinales en CDK4 en los pacientes con melanoma. Dichas mutaciones convierten a CDK4 en un oncogén autosómico dominante, pues impide que sea inhibido por p16, y permite el paso en el ciclo celular de G1 a S, a través de la fosforilación de retinoblastoma, dando paso a una excesiva proliferación celular (Bennett, 2008).

1.5.4.2. Genes de baja penetrancia

Las mutaciones en estos genes se asocian a **riesgos menores para desarrollar melanoma**, pero al detectarse con **mayor frecuencia entre la población general**, su determinación tiene un impacto mayor en la sociedad en términos de prevención sanitaria y seguimiento de pacientes con riesgo.

1.5.4.2.1. Relacionados con los rasgos pigmentarios

a) *MCR1*

El gen que codifica para *MCR1* está localizado en el extremo telomérico del cromosoma **16q24.3**. Las variaciones alélicas en el mismo explican en gran parte los cambios en los fenotipos pigmentarios y los fototipos cutáneos, como se ha comentado en apartados previos (Healy, 2004).

La secuenciación del gen que codifica para este receptor en sujetos con diferentes fenotipos cutáneos ha permitido identificar la existencia de más de 70 variantes alélicas, algunas de las cuales alteran la estructura del receptor, lo que en ocasiones modifica o anula su funcionalidad. Estos sujetos tendrían una expresión supresora en la función fisiológica del *MCR1*, es decir, los melanocitos sintetizarían feomelanina en lugar de eumelanina (García-Borrón y cols., 2005). Ante tal diversidad, se estableció por consenso entre los resultados de varios grupos de trabajo cuál era la variedad o alelo más frecuente o *común (wild type)*, que está presente en la población asiática y africana (Box y cols., 2001).

Entre las variantes de *MCR1* que afectan a su funcionamiento normal, las más estudiadas se han asociado a un fenotipo concreto: pelo rojizo, piel clara, poca capacidad de broncearse y pecas. El conjunto de estas características, se ha denominado **fenotipo RHC** (*red hair color*) y constituye

un factor de riesgo tanto para melanoma como para cáncer cutáneo no melanoma. Estas variantes se suelen subclasificar en “**débiles**” o “**r**” y “**fuertes**” o “**R**”, según la frecuencia con la que se asocian a pelo rojo, con OR (“Odds Ratio”) entre 50 y 120 para las variantes fuertes, y con OR entre 2 y 6 para las débiles (Landi y cols., 2005). Los alelos asociados a pelo rojizo corresponden a formas con pérdida parcial o total de la funcionalidad de *MCR1* (García-Borrón y cols., 2005).

Además, algunos trabajos señalan que algunos de estos polimorfismos de *MCR1* otorgarían una mayor susceptibilidad para el desarrollo de melanoma esporádico y cáncer cutáneo no melanoma de forma independiente a la presencia del fenotipo RHC, con riesgos relativos de 2 a 3,9 para melanoma (Box y cols., 2001).

Incluso en aquellos sujetos pertenecientes a familias con mutaciones germinales en *CDKN2A*, el *MCR1* juega un papel modulador del riesgo de que aparezca melanoma (Goldstein y cols., 2007). Box y cols. estudiaron el efecto derivado de la presencia de polimorfismos del gen *MCR1* en familias australianas portadoras de diferentes mutaciones en el gen *CDKN2A*. La presencia de una variante alélica del *MCR1* aumentaba el riesgo de desarrollar un melanoma tanto en portadores de mutaciones de *CDKN2A* como en no portadores. El impacto sobre el riesgo de melanoma en los portadores de un alelo de *MCR1* y una mutación en *CDKN2A*, comparado con los portadores de una única mutación del *CDKN2A*, se reflejaba al aumentar la penetrancia para

desarrollar un melanoma del 50 al 83 %, y un descenso en la edad media de diagnóstico del melanoma de 58,1 a 37,8 años (Box y cols., 2001).

Del resto de genes relacionados con los rasgos pigmentarios fenotípicos humanos, aparte de MCR1, son muchos los que se han incluido en estudios de asociación del genoma completo para conocer si incrementan el riesgo de padecer melanoma. Los que han arrojado resultados positivos en este sentido son:

b) ASIP, TYR, TYRP1, OCA2 y SLC45A2

El gen **ASIP** (cromosoma 20q11.22), como ya se ha comentado, codifica para la proteína Agouti, antagonista del receptor MCR1. Además existe un haplotipo cercano a ASIP, denominado en la literatura internacional **AH** (20q11) (Asip Haplotype). Determinados polimorfismos de ASIP y de AH, confieren mayor riesgo de melanoma en tres estudios, con OR de 1,45 (Gudbjartsson y cols., 2008), 1,68 (Nan y cols., 2009) y 1,72 (Brown y cols., 2008).

Tras el gen ASIP, el segundo y tercero en OR para riesgo incrementado de melanoma son **TYR** y **TYRP1**, con 1,21 y 1,15, respectivamente (Gudbjartsson y cols., 2008). En el caso de TYR es el SNP codificante y no sinónimo rs1126809 el asociado; y en el caso de TYRP1 es el SNP no codificante rs1408799 (Udayakumar y Tsao, 2009).

El gen **OCA2**, localizado en el cromosoma 15q11, codifica, como ya se ha comentado, para una proteína transmembrana de los melanosomas y está implicado en la determinación del color de los ojos, la piel y el pelo. Sus variantes no funcionales se asocian a la forma más común de albinismo oculocutáneo, el tipo 2, que le ha dado el nombre (Sulem y cols., 2007). Jannot y cols. han encontrado que la combinación de dos de los SNPs del gen OCA que evalúan en su estudio, se asocia a mayor riesgo de desarrollar melanoma, tras ajustar por otras características fenotípicas, incluido el análisis estratificado por color de los ojos. No obstante, ha de tenerse en cuenta que es un estudio bastante limitado pues solo incluye a 120 pacientes con melanoma y 125 controles (Jannot y cols., 2005), y además estudios posteriores de asociación del genoma completo con número mucho mayor de casos y controles donde se han analizado SNPs para OCA2, no han confirmado que este gen confiera susceptibilidad a padecer melanoma (Gudbjartsson y cols., 2008).

Finalmente, el gen **SLC45A2**, localizado en el cromosoma 5p13.3, codifica una proteína que se sitúa en la membrana melanosómica y que actúa como transportador hidrógeno/sodio, dirigiendo probablemente el tráfico de proteínas y otras sustancias al melanosoma. Las mutaciones de este gen producen el *albinismo oculocutáneo tipo IV*, pues no se produce el correcto procesamiento de la tirosinasa ni su translocación tras pasar por el aparato de Golgi. Hay dos estudios publicados, ambos en 2008, uno en población francesa (1019 casos y 1466 controles) (Guedj y cols., 2008) y otro en población

española (131 casos y 245 controles) (Fernández y cols., 2008) en los que se encuentra un efecto significativamente protector del polimorfismo Phe374Leu frente al melanoma con OR de 0,35 y 0,41 respectivamente.

1.5.4.2.2. No relacionados con los rasgos pigmentarios

a) VDR (receptor de vitamina D)

Actualmente existen múltiples investigaciones que apoyan la hipótesis de que el 1,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol, la forma activa de la vitamina D tiene efecto protector frente al desarrollo de cáncer. Este efecto deriva de la actuación de la vitamina D (hormona esteroidea) como factor de transcripción que regula el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (mecanismos fundamentales para el desarrollo y progresión del cáncer) (Mocellin y Nitti, 2008), mediante su unión a VDR, lo que lo convierte en candidato importante para moderar el riesgo de padecer cáncer. Varios estudios han intentado dilucidar si las variantes polimórficas de VDR se asocian con el riesgo de desarrollar cánceres como el de próstata, mama y riñón. En cuanto al melanoma, se ha apoyado el papel de la vitamina D como modulador del comportamiento maligno de este tumor, aunque los resultados han sido contradictorios, y existe un número limitado de pequeños estudios que han

examinado el papel de los polimorfismos del gen VDR (12q13) en el riesgo de padecer melanoma (Randerson-Moor y cols., 2009).

Existen **dos metaanálisis** recientes que revisan los resultados publicados hasta ese momento en los que se intenta determinar el papel de los siguientes polimorfismos de un solo nucleótido (**SNPs**) de **VDR en el melanoma**:

- *Polimorfismos FokI, BsmI, TaqI, EcoRV y Cdx2*: se concluye que ninguno de estos polimorfismos presenta asociación significativa con el riesgo de padecer melanoma, salvo BsmI que podría provocar una disminución de la actividad del sistema de la vitamina D y por tanto, un incremento del riesgo. No obstante no se ha identificado el efecto funcional que tiene sobre VDR (Mocellin y Nitti, 2008).

- *Polimorfismos FokI, BsmI, TaqI, Cdx2, ApaI y GATA*: se concluye que existe un riesgo incrementado de melanoma para el alelo T de FokI y un riesgo reducido para el alelo A de BsmI (Randerson-Moor y cols., 2009).

Ante la **disparidad de resultados** y la falta de reproducibilidad de los mismos, serán necesarios más estudios para poder realizar afirmaciones certeras sobre la relación entre melanoma y VDR.

b) Genes de reparación del DNA, MDM2, EFG, *GSTM1* o *GSTT1*, B-RAF y p53.

También polimorfismos en los **genes cuyas proteínas están implicadas en la reparación del ADN** cuando éste es dañado, han sido objeto de estudio como posibles factores de riesgo de melanoma. Mocellin y cols. realizan un metaanálisis en el que incluyen solo los SNPs que han sido estudiados en al menos dos o más trabajos, que son 3 en XPD y uno en ERCC1, XPF, XPG, XRCC1, XRCC3. De todos ellos, solo el SNP rs13181 de *XPD/ERCC2* muestra asociación significativa con la elevación del riesgo de melanoma (Mocellin y cols., 2009).

Algunos polimorfismos en ***MDM2***, el regulador negativo más importante de p53, se han asociado a un aumento de riesgo de padecer algunos cánceres como el de hígado (Akkiz y cols., 2010) o el de colon, entre otros, aunque en el melanoma esta relación no ha podido ser confirmada. Si bien, si se han relacionado con un mayor Breslow (Capasso y cols., 2010).

Otro gen que se ha considerado ha sido ***EFG*** (Epidermal Growth Factor), con resultados poco concluyentes (Casula y cols., 2009), así como genes que regulan enzimas implicadas en la detoxificación de productos con estrés oxidativo causado por agentes (radiación ultravioleta y otros), como ***GSTM1* o *GSTT1*** (glutathione-S transferase mu1 y theta 1, respectivamente), aunque

otros trabajos no han confirmado esta hipótesis (Mössner y cols., 2007). También se han estudiado mutaciones o polimorfismos germinales en **B-RAF**, un gen que se encuentra mutado en la gran mayoría de los nevi y de los melanomas, y al que se atribuye un papel clave en su evolución, sin embargo, hasta la fecha, las publicaciones existentes sobre la existencia de SNPs en este gen y la susceptibilidad a padecer melanoma son controvertidas, existiendo publicaciones a favor de esta asociación y otras en contra (Jackson y cols., 2005).

Por último, algunos trabajos han encontrado mayor riesgo de tener melanoma en sujetos que presentan polimorfismos de tipo SNP de **p53**, siendo el más frecuentemente estudiado, el que se localiza en el codón 72 de dicho gen, con resultados controvertidos, a favor (Li y cols., 2008) y en contra de esta asociación (Capasso y cols., 2010).

1.6. Factores Genéticos Implicados en el Cáncer

1.6.1. Cáncer hereditario y genes de alta penetrancia

Durante las **dos últimas décadas**, la investigación sobre los factores causantes de la susceptibilidad heredada a padecer cáncer ha estado centrada en la identificación de **genes de alta penetrancia o alta susceptibilidad**. Mutaciones germinales de estos genes dan lugar a un patrón de **herencia mendeliano**, en el que la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad se transmite de forma autosómica dominante. Ejemplos clásicos de genes de alta penetrancia son BRCA1 y BRCA2, implicados en el síndrome de cáncer de mama y ovario familiar (Halls y cols., 1990), el gen APC implicado en el cáncer de colon polipósico familiar (Bodmer y cols., 1987) MLH1 y MSH2 asociados al cáncer de colon no polipósico, entre otros. La **frecuencia** de estas mutaciones es **muy baja en la población general** (0,001 de media) pero cuando aparecen, el **riesgo que confieren a padecer cáncer es muy alto**, dando lugar a estos patrones de herencia mendeliana.

Sin embargo, la mayoría de los cánceres son de origen esporádico, donde las alteraciones genéticas son somáticas y se hallan únicamente en el tejido tumoral del individuo afectado, y solo entre el **5%-10%** presentan un claro **componente hereditario**. Los **cánceres hereditarios** suelen implicar la predisposición al desarrollo de tumores concretos que suelen aparecer a una **edad más temprana** que los esporádicos, y el riesgo de desarrollarlo está

relacionado con el grado de parentesco con familiares que ya han padecido la enfermedad. Las neoplasias que afectan a los miembros de una familia suelen ser de un tipo concreto, pero también pueden encontrarse otros tumores o incluso una agrupación de distintas neoplasias en una misma familia. Por otra parte, la incidencia elevada de casos de cáncer en una familia, no implica necesariamente una base genética, sino que pueden existir factores ambientales que afecten a dicha familia en concreto (García Foncillas, 2001).

La **existencia de un cáncer hereditario** se demuestra objetivamente identificando la mutación en un ***gen concreto en la línea germinal***. Los genes involucrados en su desarrollo regulan en las células normales, el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis, y **pueden dividirse en tres grupos principales:**

1. ***Protooncogenes***. En caso de producirse una alteración genética en un protooncogén, el defecto se denomina *mutación con ganancia de función*, ya que la aberración aumenta o altera la función del gen, generándose un potencial oncogénico.

Encontrar mutaciones en protooncogenes es muy poco frecuente en casos de cáncer de tipo familiar. Hay enfermedades, como el linfoma de Burkitt, en las cuales los oncogenes desempeñan un papel importante en el desarrollo del tumor, pero no es un papel primario. Como excepción cabe destacar el oncogén RET, causante de un tipo de

cáncer hereditario denominado MEN2A (*multiple endocrine neoplasia type 2A*) (Goodfellow, 1994).

- 2. Genes supresores de tumores.** Si la alteración se produce en un gen supresor de tumores, el defecto se denomina *mutación con pérdida de función*.

La función de estos genes es ***inhibir o suprimir la proliferación de células cancerosas***, que se evidenció gracias al trabajo de **Harris y cols. en 1969**, donde se fusionaron células cancerígenas con células normales y se observó que, a pesar de que las nuevas células híbridas mantenían características fenotípicas similares a las células cancerígenas, éstas perdían la capacidad de formación de tumores al ser inyectadas en animales. Esto parecía indicar la presencia de uno o varios genes (supresores de tumores) en la célula normal que impedía la tumorigenicidad de la célula cancerígena.

Las mutaciones en estos genes son **recesivas** en cuanto a su capacidad de desarrollar tumores, ya que es necesaria la **“anulación” de los dos alelos** para que la célula se convierta en cancerígena (Harris y cols., 1969).

En la actualidad se conocen más de 30 genes supresores de tumores y es clara su implicación en el desarrollo de cáncer, tanto hereditario como esporádico (García Foncillas, 2001) (Tabla 6).

Gen supresor	Síndrome hereditario	Cánceres esporádicos
P53	Enf de Li-Fraumeni	Mama, vejiga, hígado, esófago, cerebral, colorectal, leucemia linfomas, pulmón, sarcoma, ovario
Rb	Retinoblastoma	Vejiga, mama, retinoblastoma, esófago, pulmón, sarcomas
BRCA1	Ca Mama y ovario	Mama, ovario
BRCA2	Ca de mama	Mama, páncreas, uretra, colon, ovario
NF-1	Neurofibromatosis I	Colon, astrocitomas
NF-2	Neurofibromatosis II	Meningioma, schwanoma, ependimoma
APC	Poliposis adenomatosa familiar	Colorectal, páncreas, estómago,
CDKN2A	Melanoma familiar	Melanoma, páncreas

Tabla 6: Algunos genes supresores de tumores asociados a cánceres esporádicos y síndromes hereditarios. Elaboración propia.

3. **Genes encargados de mantener la estabilidad genómica.** Son genes de reparación del ADN, entre otros, y también son inactivados por *mutaciones con pérdida de función* (Haber y Fearon, 1998).

La implicación de estos genes en el desarrollo de cáncer se debe a la asociación observada entre defectos en genes de reparación (genes

MMR) y el desarrollo de cáncer colorrectal, tanto de tipo esporádico como hereditario. En el hombre se han identificado seis MMR: *hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH3* y *hMSH6*.

Se ha observado que estos genes tienen un comportamiento similar al de los genes supresores, en el sentido de que es necesario que **ambos alelos** estén **mutados** para que se produzca la **pérdida de su función**, facilitándose el desarrollo del **cáncer**. Debido a este hecho, algunos autores engloban los genes supresores tradicionales junto con los genes reparadores dentro de una misma categoría: “genes supresores de tumor” (García Foncillas, 2001).

Los estudios dirigidos a caracterizar los genes implicados en los **síndromes de cáncer familiar** han proporcionado numerosas pruebas que apuntan a la **inactivación de genes supresores tumorales**, siendo raras las alteraciones que activan oncogenes en la línea germinal.

Hay que hacer hincapié en que en el **cáncer hereditario** lo que **se transmite** a la descendencia no es el cáncer propiamente dicho, sino un aumento **del riesgo de desarrollarlo** y como se ha comentado, sólo en aproximadamente un 5-10% de los casos de cáncer, la causa es una mutación en genes de susceptibilidad a cáncer en la línea germinal. Sin embargo, es necesario que se produzcan aberraciones somáticas adicionales, ya que las

alteraciones genéticas en la línea germinal son casi siempre de carácter recesivo, manteniéndose el funcionamiento correcto mientras persista una copia normal del gen supresor de tumores (García-Foncillas y cols., 2001).

1.6.2. Cáncer esporádico y genes de baja penetrancia

Sin embargo, **la inmensa mayoría de las enfermedades** comunes no siguen modelos de herencia monogénica mendeliana simple regulada por un único gen, sino que son el resultado de la ***interacción de múltiples genes entre sí y con factores ambientales*** (Hedrick, 2000). Son las enfermedades multifactoriales o complejas, como por ejemplo, la cardiopatía isquémica, la hipertensión, la obesidad, el alcoholismo, las enfermedades mentales, la diabetes, la susceptibilidad a padecer procesos trombóticos o el cáncer.

En medicina es habitual considerar la enfermedad como una variable discreta, dicotómica, con dos posibles estados: individuos sanos frente a individuos enfermos. Sin embargo, la herencia de las enfermedades con un componente genético no siempre es así. La genética de las enfermedades complejas permite interpretar la susceptibilidad o predisposición de cada individuo a padecer una enfermedad como una variable continua de riesgo. Esta variable es un fenotipo complejo, no observable ni medible directamente, pero deducible mediante modelos matemáticos (Duggirala y cols., 1997). El conjunto de genes responsables y todas sus interacciones determinan la susceptibilidad genética a la enfermedad para cada individuo (Guttmacher y Collins, 2002).

Aquellos individuos que rebasan un determinado umbral de este gradiente, manifiestan clínicamente la enfermedad. En otras palabras, lo que

está regulado no es la enfermedad en sí misma sino la predisposición a padecerla.

La proporción de variabilidad de un rasgo o una enfermedad atribuible a componentes genéticos recibe el nombre de **heredabilidad** y es un concepto muy relevante en epidemiología genética, porque siendo relativamente fácil de calcular, proporciona sentido científico a la búsqueda de genes.

Contrariamente a lo que ocurre en los rasgos mendelianos, cuya variación se explica por mutaciones de un único gen, hay una gran cantidad de rasgos que están influenciados por múltiples genes. Por tanto, el valor de un fenotipo dependerá del contenido informativo de diversas zonas del genoma, cada una de ellas aportando una contribución (posiblemente pequeña) al resultado final. En el caso de las enfermedades complejas, cada uno de estos genes por sí solo, puede no ser suficiente para desencadenar el problema, pero contribuye en cierto grado al incremento de riesgo. Por esos se les llama **genes de susceptibilidad**.

La **enfermedad** es así un fenómeno complejo: depende del estado de muchos otros fenotipos (llamados **fenotipos intermedarios**) y éstos, a su vez, pueden depender de la información residente en **múltiples genes** distintos, interaccionando entre ellos y con el **ambiente** (Cooper, 2003) (Figura 28). En la mayoría de procesos biológicos la actuación del conjunto de factores ambientales tiene un gran impacto. Además su espectro y procedencia son

ampliamente variables. Todo esto hace que la **identificación de factores genéticos que predisponen a enfermedades comunes** y su relación entre ellos y con el medio sea no sólo importante, sino también tremendamente complicado (Guo y Lange, 2000).

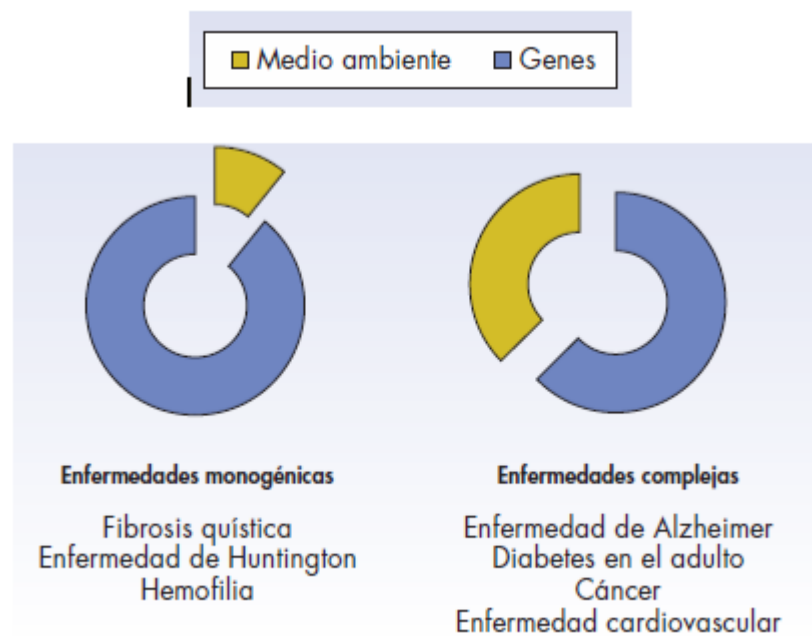


Figura 28: Contribución de los factores genéticos al desarrollo de enfermedades monogénicas y de enfermedades complejas. Modificado de LaFuente, 2004.

La **mayoría de cánceres**, presenta también un componente hereditario que reside en los genes de baja penetrancia. A diferencia de los anteriores, las **variantes de baja penetrancia** son **comunes** a la población general y el **riesgo** que confieren a padecer la enfermedad es **bajo o moderado**. A nivel individual cada variante modificaría muy poco el riesgo, pero en unión con otros factores, tanto genéticos como ambientales, serían responsables de las

diferencias en la susceptibilidad de padecer cáncer que existen entre los individuos de la población general.

1.6.3. Polimorfismos

En el genoma humano encontramos un gran número de variaciones que alteran su secuencia (Guo y Lange, 2000). Si tomamos dos individuos al azar y comparamos sus secuencias de **ADN** genómico podremos comprobar que el **99,9%** de sus secuencias son **idénticas**. En el **0,1%** restante se encuentran las **diferencias que condicionan la susceptibilidad a las enfermedades**, el metabolismo de los medicamentos, así como multitud de diferencias entre los individuos.

Cuando el grado de variación en un punto específico del ADN da como resultado una **variante que está presente en más del 1% de la población** estamos en presencia de un **polimorfismo**. Si la incidencia de esta variante es menor del 1% estamos ante una mutación. Sin embargo, esta definición no se puede generalizar ya que lo que en una población se considera una mutación, en otra es un polimorfismo (Huang y cols., 2006).

En función de si el polimorfismo **afecta o no a regiones codificantes** del genoma existen:

- **Polimorfismos génicos:** son polimorfismos que se encuentran en las regiones codificantes del genoma (regiones que codifican para una proteína –exones-) (Figura 29).

- **Polimorfismos genéticos:** son polimorfismos que se encuentran en las regiones no codificantes (regiones que no codifican para ningún producto génico –intrones, promotores, etc.-), pero que pueden tener una función reguladora o simplemente estructural.

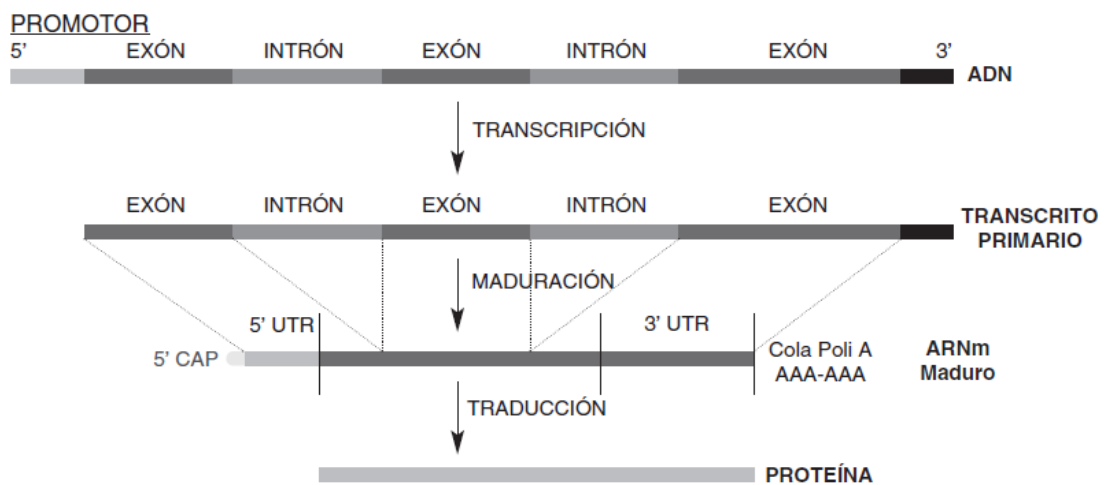


Figura 29: Estructura de un gen, transcripción y traducción a proteína. Fuente: Gargacho y cols., 2005.

En términos científicos, el **polimorfismo** se define como «la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un *locus* determinado». Los alelos son variaciones de la secuencia del ADN presentes en una posición definida (*locus*) en un cromosoma. Consecuentemente, en una célula diploide cada *locus* está ocupado por dos alelos, uno de origen materno

y otro de origen paterno, situados en sendos cromosomas homólogos (Lafuente, 2004).

Debido a que sólo el 3%-5% del ADN humano codifica para la producción de proteínas, la mayoría de las mutaciones se encuentran en regiones no codificadoras. Consecuentemente, no dan ningún tipo de alteración fenotípica, pero son de un gran interés para la búsqueda de genes relacionados con enfermedades y para la identificación genética de individuos.

Término	Definición
Alelo	Una de las formas variantes de un gen en un <i>locus</i> o de un marcador particular en un cromosoma
Bases púricas	Adenina (A) y guanina (G)
Bases pirimidínicas	Citosina (C) y timina (T)
Cebador	Secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR
Enzimas de restricción	Proteínas que tienen la propiedad de reconocer sitios específicos de ADN y cortar la moléculadel ADN en ese sitio
<i>Enhancer</i>	Secuencia de ADN en la región promotora que intensifica la expresión de un gen
Exón	Región de un gen que contiene la información para producir la proteína del gen
Factor de transcripción	Proteína que se une al promotor y que se requiere para la transcripción
Fenotipo	Rasgos o características visibles de un individuo
Genotipo	Constitución genética del individuo
Haplotipo	Conjunto de alelos polimórficos que ocurren en un cromosoma
Intrón	Secuencia no codificadora de ADN que separa a dos exones
5'UTR	Extremo 5' del transcrito primario que contiene el codón de inicio (del inglés, <i>5'untranslated region</i>)
3'UTR	Extremo 3' del transcrito primario que contiene el codón de parada (del inglés, <i>3'untranslated region</i>)

Tabla 7: Conceptos de genética. Fuente: Gargacho y cols., 2005.

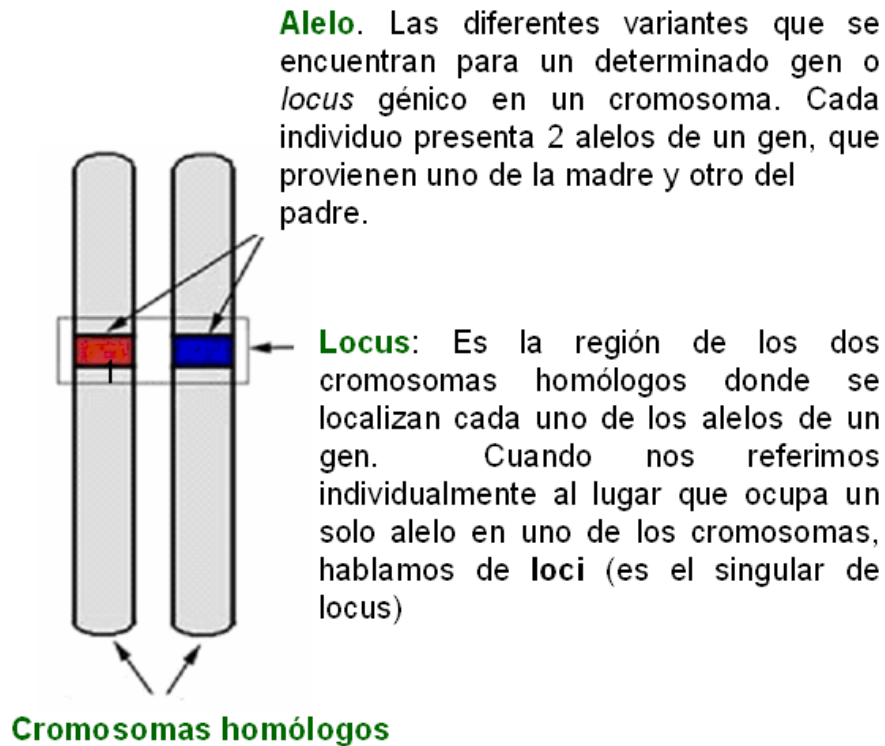


Figura 30: Gen, alelo, loci y locus. Modificado de <http://www.nwcreation.net/articles/recombinationreview.html>

Estas regiones son las responsables de la exclusividad del perfil genético de un individuo (Luque y Herráez, 2001).

Atendiendo a la longitud o cantidad de nucleótidos que se han cambiado para generar una variante, los polimorfismos se pueden dividir en tres clases fundamentales:

- **Variantes que se generan por el cambio en un nucleótido único**, conocidas como SNP (single nucleotide polymorphism) (Luo y cols., 2010) (Figura 31).

- **Variantes de longitud que afectan hasta pocos centenares de nucleótidos**. Existen varios tipos: inserciones y deleciones (agrupadas bajo el término INDELS), microsatélites, números variables de repeticiones en tandem (VNTR -variable number of tandem repeats), etc. (Yang y cols., 2010).

- **Variantes estructurales** o copy number variants (CNV)

Todas estas variantes pueden producir alteraciones de forma directa en el fenotipo del individuo. En otras ocasiones no producen cambios pero se utilizan como **marcadores para identificar la verdadera alteración molecular asociada a la enfermedad** (Shastry, 2009).

1.- SNP

Los SNPs representan cambios de un solo nucleótido en la secuencia del ADN. Supone la **forma más simple y abundante de variación del ADN**

entre los individuos con una frecuencia de aproximadamente uno de cada 200 a 1.000 pares de bases.

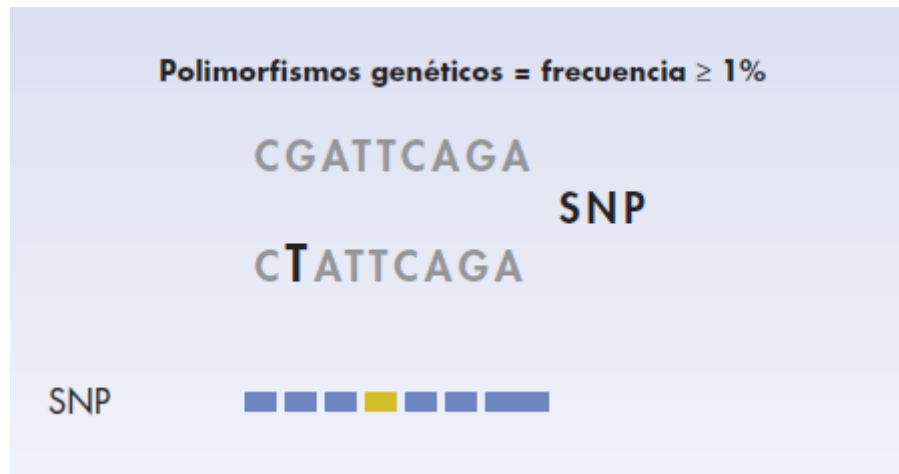


Figura 31: Ejemplo de polimorfismo genético de un solo nucleótido (SNP).

Modificado de LaFuente, 2004.

Los SNPs pueden ser responsables de la diversidad entre los individuos, la evolución del genoma, los rasgos familiares más comunes (como el pelo rizado), las diferencias interindividuales en la respuesta a los fármacos, y las enfermedades comunes complejas como la diabetes, la obesidad, la hipertensión, los trastornos psiquiátricos o el cáncer.

Existen distintos tipos de SNPs:

- Cuando el SNP ocurre dentro de la región codificadora del gen, o **exón**, la probabilidad de que se altere la función biológica de la proteína es

mayor, ya que el cambio de base puede traducirse en la sustitución de un aminoácido por otro.

- Mucho más frecuentemente, los SNPs ocurren en regiones del gen que no se traducen en proteína: región no codificadora. Sin embargo, estos SNPs también pueden tener efectos biológicos. Por ejemplo, un SNP en la **región promotora** de un gen (parte de un gen que contiene la información necesaria para activarlo o desactivarlo) puede alterar la afinidad por la unión con factores de transcripción, o alterar la **actividad enhancer** (potente intensificador de la expresión de un gen), variando de esta forma los niveles de transcripción del gen y produciéndose, como consecuencia, cambios en los niveles de proteína. Los SNPs en las **regiones 5'UTR y 3'UTR** (regiones 5' y 3' del ARNm, no traducidas) pueden alterar la estabilidad del ARN mensajero -ARNm-), afectando su traducción a proteína. Parece menos probable que los SNPs presentes en **intrones** (región no codificadora de un gen) también tengan un significado funcional. Es interesante señalar que los SNPs situados en intrones son los más frecuentes, seguidos de los que se producen en regiones promotoras (Salisbury y cols., 2003).

Por lo tanto, la identificación de numerosas variaciones en los genes y el análisis de sus efectos pueden conducir a una **mejor comprensión de su impacto en la función genética y la salud de un individuo** (Shastry, 2009).

Tipo de SNP	Localización	Efecto funcional	Frecuencia en el genoma
Cambio en el aminoácido (aa) no sinónimo	Zona codificante (cSNP)	Cambio a otro aa con propiedades diferentes	Baja
Provoca cambio en el aa no sinónimo	Zona codificante (cSNP)	Cambio a otro aa con iguales propiedades	Baja
No da lugar a cambio de aa	Zona codificante (cSNP)	Puede alterar el procesamiento de ARN	Media
En zona promotora o reguladora de un gen	Promotor, 5' UTR ¹ , 3' UTR (rSNP)	Puede alterar la expresión de un gen	Baja-Media
En zona de unión exón-intrón	En el intrón, a < 10 nucleótidos del exón	Puede alterar el procesamiento de RNA	Baja
Intrónico	En el intrón	Podría afectar la expresión o estabilidad del ARN	Media
En zona intergénica	Zona no codificante	Podría afectar la expresión	Alta

Tabla 8: Tipos de SNPs según su localización y su función.

Como se ha apuntado anteriormente, dos copias de ADN difieren aproximadamente en el 0,1% de los nucleótidos. Se estima que en la población mundial hay 10 millones de SNPs comunes. Estos 10 millones de SNPs suponen el 90% de la variación en el genoma, el 10% restante se debe a una gran cantidad de variantes que son raras en la población. La existencia de **SNPs concretos es clave para genotipar una muestra de ADN** (Cullis, 2002; Jones y cols., 2009).

Además, el hecho de que los SNPs sean tan numerosos y estén repartidos al azar por todo el genoma hace que sean marcadores genéticos **ideales para identificar genes de baja penetrancia**. Otro dato importante que los hace adecuados para los estudios del genoma completo es que se ha estimado que, de los 10 millones de SNPs, sólo se requieren unos 500.000 SNPs para cubrir todo el genoma en estudios de asociación para identificar variantes que confieren susceptibilidad a una enfermedad. Estos 500.000 SNPs se han seleccionado cuidadosamente de forma que son representativos de la totalidad de los SNPs del genoma, debido al fenómeno de desequilibrio de ligamiento (fenómeno en el que variantes genéticas cercanas en un cromosoma tienden a heredarse de forma conjunta más de lo que se esperaría por el azar) (Cullis, 2002; Huang y cols., 2006; Jones y cols., 2009).

2.- INDEL

Se estima que existen unos tres millones de INDEL en el genoma humano. Se agrupan en cinco categorías:

- Inserción o delección de un único nucleótido.
- Expansiones de varios nucleótidos en pares de dos a quince repeticiones.
- Inserciones de elementos móviles del genoma (transposones).
- Inserción y delección de secuencias de ADN al azar.

Estas variaciones son responsables de distintas enfermedades humanas por ejemplo:

- El síndrome del cromosoma X frágil y la corea de Huntington están causadas por inserciones de ADN, denominadas expansiones de tripletes (Ranum y Day, 2004).
- Una delección de tres nucleótidos es la principal mutación que causa la fibrosis quística. Se han identificado transposones responsables de casos de hemofilia, distrofia muscular o cáncer (Mills y cols., 2006).

3.- CNVs

Se trata de duplicaciones, delecciones o inversiones del material genético por encima de los 1000 nucleótidos, hasta centenares de miles de nucleótidos.

Se estima que existen más de 2000 CNVs en el genoma y, que como promedio, dos individuos difieren entre sí en unos 100 CNVs (Redon y cols., 2006). A pesar de ser menos frecuentes que las otras dos variantes, al producir alteraciones en una región más extensa del genoma, el riesgo de producir alteraciones fenotípicas es muy alto.

Actualmente se ha identificado la relación de los CNVs con distintas enfermedades como el síndrome de Williams y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o en la susceptibilidad a la infección por el VIH-1 y la distinta respuesta al tratamiento para el SIDA (Szigeti y Lupski, 2009).

1.6.4. Recombinación, ligamiento/desequilibrio de ligamiento, y bloques haplotípicos.

1.6.4.1. Recombinación

Las células de la mayoría de los organismos, incluyendo los mamíferos, son eucariotas, es decir, almacenan su información genética en un núcleo celular. La unidad hereditaria de mayor tamaño es el cromosoma, formado por ácido desoxirribonucleico (ADN) densamente empaquetado y proteínas estructurales. Cada cromosoma contiene miles de genes, cada uno de los cuales incluye la información necesaria para la síntesis de una proteína o subunidad proteica.

Con la excepción de las células sexuales, los cromosomas en las células humanas se presentan en pares (23 pares de cromosomas). Un miembro de cada par de cromosomas es heredado del padre de una persona y el otro miembro del par se hereda de la madre. Sin embargo, los cromosomas no pasan de una generación a otra como copias idénticas. Por el contrario, cuando los gametos se están formando, los pares de cromosomas pasan por un proceso conocido como **recombinación**. Los miembros de cada par de cromosomas se unen y se produce intercambio de fragmentos. El resultado es un cromosoma híbrido que contiene piezas de ambos miembros de un par de cromosomas homólogos, y este cromosoma híbrido es el que pasa a la siguiente generación. Por tanto, **cada cromosoma transmitido a la**

descendencia estará formado por fragmentos largos que son una copia exacta de los del progenitor, pero combinando partes del cromosoma materno y del paterno.

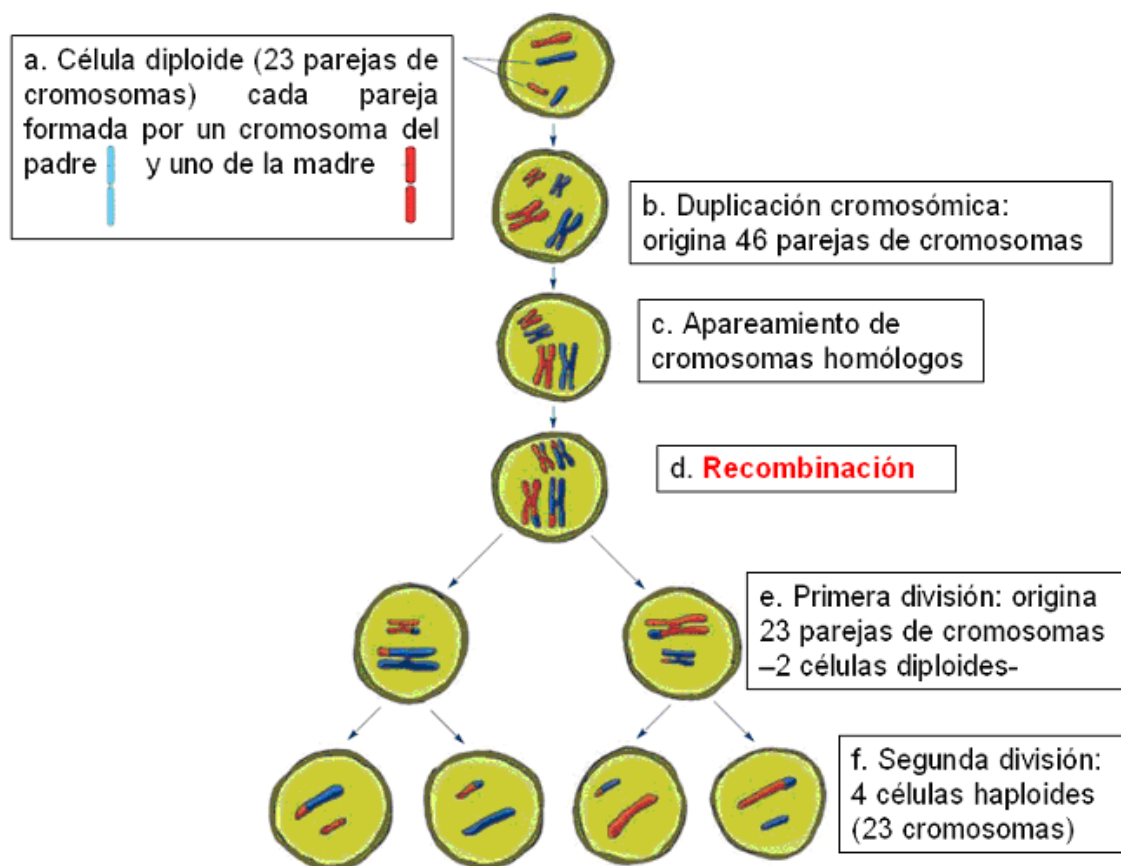


Figura 32: División meiótica. Modificado de http://publications.nigms.nih.gov/thenewgenetics/images/ch1_meiosis.jpg

La división especial que se produce en las células que originarán los gametos, se llama **meiosis o división meiótica**, donde se produce la **reducción del número cromosómico** (de diploide a haploide), y el reordenamiento del material genético (**recombinación**) procedente de cada uno de los progenitores (Figura 32).

Estas reordenaciones del ADN mediante recombinación genética pueden variar la estructura y la función de los genes así como el grado de expresión de los mismos (Haig, 2010) (Figura 33).

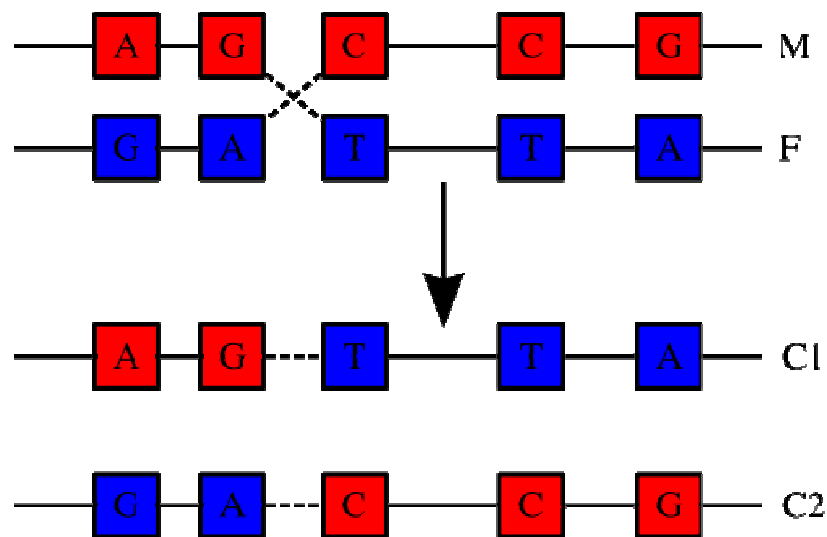


Figura 33: Recombinación. Fuente: [http://es.wikipedia.org/wiki /Archivo: Chromosomal_Recombination.svg](http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Chromosomal_Recombination.svg)

1.6.4.2. Ligamiento/desequilibrio de ligamiento

Se denomina **ligamiento** a la **asociación física entre dos loci**, esto es, su cercanía en una misma hebra de ADN, lo que repercute en una baja frecuencia de recombinación entre ellos durante la meiosis, y, por tanto, en una mayor probabilidad de herencia conjunta. Esto se debe a que los quiasmas (estructuras de entrecruzamiento generadas durante la recombinación), se producen al azar a lo largo de un cromosoma; de este modo, a menor distancia entre dos *loci*, menor probabilidad de que se dé un quiasma y, por tanto, se generen variantes recombinantes. Cuanto más cerca estén el uno del otro menor posibilidad habrá de que ocurra el evento de recombinación y viceversa.

La disposición de dos *loci* con **máxima frecuencia de recombinación** (esto es, de 0,5 o, lo que es lo mismo, **del 50%**) es sobre **cromosomas separados**, puesto que así, si sólo se transmite en las células germinales una copia del genoma y existen dos cromosomas homólogos (el paterno y el materno) en la célula diploide de la línea germinal, su segregación al azar dará lugar a la transmisión de uno de los dos, y 1/2 corresponde a la mencionada frecuencia de recombinación de 0,5. Cuando los dos *loci* se encuentran en cromosomas distintos **se dice que no están ligados**: es una situación de no ligamiento (Dyer, 2007).

Como se ha mencionado, cada alelo debería transmitirse, por azar, el 50% de las veces, pero si lo hace en una frecuencia significativamente mayor

(y por tanto, con una frecuencia de recombinación menor del 50%) se infiere que este alelo en cuestión debe estar ligado o en “desequilibrio de ligamiento” con el alelo responsable de la enfermedad (los loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria con la separación de los cromosomas) o ser, él mismo, el causante del trastorno (The International HapMap Consortium, 2003).

La probabilidad de que entre dos loci cercanos se produzca una recombinación es baja (menor de lo que cabría esperar por azar -<50%-), tanto más baja cuanto más cerca se encuentren, y están por tanto en desequilibrio de ligamiento. Por ello, el ligamiento genético se puede definir también como la tendencia de dos genes del mismo cromosoma a mantenerse juntos durante la meiosis. La fortaleza de este ligamiento es usada como unidad de medida (Morgan) de la distancia entre dos genes unidos. Un centimorgan denota un evento de recombinación del 1% (lo que significa que los genes en cuestión se mantienen unidos el 99% del tiempo durante la meiosis). Una distancia genética de 1 cM se refiere a dos genes que están relativamente cerca el uno del otro. La distancia total del genoma humano está estimada en 3000 cM, por tanto 1 cM corresponde aproximadamente a 1 millón de pares de bases (Morton, 1995).

1.6.4.3. Bloques haplotípicos

El conjunto de alelos que se transmite de forma conjunta en una cadena lineal de ADN se denomina **haplotipo**. Los nuevos haplotipos se forman por mutaciones espontáneas o por la combinación del material genético de los padres. De tal forma que los cromosomas de cada individuo son un mosaico de sus padres. Un estudio reciente sugiere que entre el **65-85% del genoma humano puede estar contenido en bloques de haplotipos**.

El desequilibrio de ligamiento es muy útil, ya que permite agrupar los polimorfismos en áreas que se heredan en bloque. De esta forma, si no conocemos la mutación concreta responsable de una enfermedad, haciendo un estudio genético podemos identificar otros polimorfismos relacionados con la mutación y así, aproximarnos al área genética relacionada con la enfermedad. Y también es posible que si aparece una mutación que genera un polimorfismo responsable de la enfermedad, es posible que otros polimorfismos cercanos también estén asociados con ella (Daly y cols., 2001).

La evidencia de que el genoma humano está constituido por bloques haplotípicos, con apenas recombinación dentro de cada bloque, ha abierto una nueva etapa de ilusión. Ahora sabemos que hay segmentos de cromosomas ancestrales que no se han roto por recombinación y que están separados por

segmentos donde la recombinación es frecuente. Estos segmentos son los **bloques haplotípicos** (Gabriel y cols., 2002).

Esto quiere decir que en un bloque donde hay, por ejemplo, 30 o 40 SNPs, por definición todos polimórficos, en realidad sólo hay unas pocas variaciones haplotípicas. Así, en una población dada, el 55% de las personas podría tener una versión del haplotipo; el 30%, otra; el 8%, una tercera, y el resto, unos pocos haplotipos menos comunes (Figura 34).

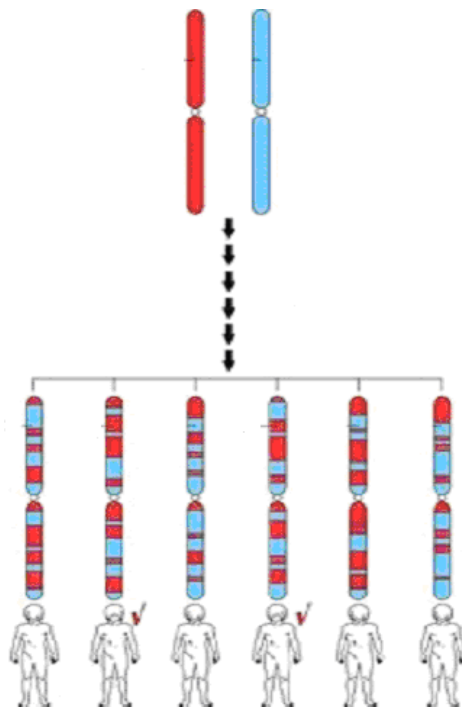


Figura 34: Bloques haplotípicos.

Modificado de <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/originhaplotype.html>.en

Si conociésemos la estructura de estos bloques e identificásemos los Tag SNPs (SNPs marcadores) que definen la variación en cada bloque, podríamos reducir muy significativamente el número de SNPs necesarios para un estudio de asociación. Se calcula que hay aproximadamente de 300.000 a 600.000 Tag SNPs, que es considerablemente menos que 11 millones de SNPs, lo que posibilita hacer estudios de asociación con una eficacia mucho mayor y hace que sean asequibles incluso los barridos genómicos globales (The international HapMap Consortium, 2003).

Gracias al ADN mitocondrial sabemos que somos una especie relativamente joven que surgió en África hace algo menos de 150.000 años. Cuando los humanos migraron de África llevaron con ello parte de la variación que había en la población ancestral, aunque no toda. Como resultado de esto, los haplotipos vistos fuera de África tienden a ser subgrupos de los que se encuentran allí. Además, los bloques haplotípicos de las poblaciones no africanas tienden a ser más largos que los encontrados en poblaciones africanas, ya que su historia es mucho más larga y han tenido más tiempo de romperse por episodios de recombinación.

Dentro de un bloque haplotípico, las frecuencias de los haplotipos varían de región a región debido al azar, a fenómenos de selección y a otros mecanismos genéticos. Al mismo tiempo, mutaciones en las secuencias de ADN han creado nuevos haplotipos que también tienen distribuciones poblacionales.

Los más recientes, por ejemplo, no han tenido aún tiempo de extenderse fuera de la población y el área geográfica donde se han originado.

Y ésta fue la finalidad del proyecto internacional HapMap, que consiste no sólo en un catálogo de las variantes genéticas comunes simples que ocurren en el genoma humano, y en el análisis de cómo están distribuidas esas variantes en las distintas poblaciones humanas, sino también en el dibujo de los bloques haplotípicos de las principales poblaciones y en la identificación de los Tag SNPs que definen la variación en cada bloque. La finalidad última del proyecto es encontrar, gracias a este esfuerzo, genes involucrados en enfermedades complejas y entender mejor la respuesta individual a los fármacos (farmacogenética) (Cariacedo, 2007).

1.7. Estudios Genéticos a Gran Escala

1.7.1. Diseño de estudios que identifican factores genéticos que predisponen a enfermedades.

Uno de los grandes retos de la investigación actual es determinar qué genes, y dentro de estos genes, qué variantes genéticas son las que causan las enfermedades complejas en general (Elosua y cols., 2009), y entre ellas, el melanoma en particular. Así se ha descubierto cierta predisposición genética en enfermedades como la diabetes mellitus tipo I (HLA, insulina y CTLA4), la enfermedad de Alzheimer (APOE), la trombosis venosa profunda (fac V), las enfermedades inflamatorias intestinales (NOD2 y 5q31), la hipertrigliceridemia (APOAV), la diabetes mellitus tipo 2 (PPARG), la esquizofrenia (neuregulina 1), el asma (ADAM33), el ictus o la “muerte súbita” (PDE4D) y el infarto agudo de miocardio (LTA), entre otras.

La búsqueda de factores genéticos que, o bien determinan, o bien alteran el riesgo de padecer una enfermedad, es compleja, y puede abordarse de formas distintas:

- El **muestreo** puede hacerse escogiendo sujetos emparentados (familias) o sujetos no relacionados.

- Los **marcadores genéticos** utilizados pueden ser microsatélites (de alto poder informativo) o polimorfismos de un único nucleótido (menos informativos pero mucho más abundantes en el genoma).
- La **estrategia estadística** puede centrarse en el análisis de ligamiento o basarse en estudios de asociación.
- La **aproximación metodológica** puede incidir en una región concreta partiendo de un postulado apriorístico (selección de un gen candidato) o barrer todo el genoma, dejando a parte cualquier preconcepción (análisis global del genoma).

Estas cuatro variables dan lugar a un gran número de combinaciones posibles. La decisión adecuada para cada dicotomía depende del tipo de enfermedad que se analice, del tipo de estudio, de las innovaciones técnicas (que amplían las posibilidades y abaratan costes a un ritmo muy intenso) y de los avances teóricos, que se producen a gran velocidad (Vink y Boomsma, 2002).

1.7.2. Identificación de genes que determinan susceptibilidad a una enfermedad

Existen 2 estrategias generales para la identificación de *loci* o genes que determinan susceptibilidad a una enfermedad: el análisis de ligamiento y los estudios de asociación.

En primer lugar, es importante obtener **evidencia** de que al menos una fracción de **la enfermedad está determinada genéticamente**. Para ello son útiles los estudios de agregación familiar, los de gemelos o los de emigrantes.

En segundo lugar, hay que identificar dónde están los genes de interés para la enfermedad (análisis de ligamiento y estudios de asociación) (Cardon y Bell, 2001).

1.7.2.1. Análisis de ligamiento

El análisis de ligamiento basa su estrategia en el fenómeno característico de la transmisión del material hereditario entre padres e hijos: la recombinación genética, el ligamiento y el desequilibrio de ligamiento (Vink y Boomsma, 2002). Por ejemplo, si los miembros de una familia están afectados por un rasgo o una enfermedad que se hereda en la misma, comparten

también un marcador genético, y se puede concluir que ambos (gen causal y marcador) están físicamente próximos (Rodríguez de Castro y cols., 2005).

El análisis de ligamiento es el **primer paso para aislar el gen responsable** de una enfermedad. Este tipo de estudios requiere la participación de varias **familias integradas por individuos afectados y no afectados** por la enfermedad. No presupone, *a priori*, ninguna hipótesis acerca del papel de un gen o genes específicos y **sólo permite al investigador ubicarlo en un área concreta del cromosoma** (mapeo meiótico o *positional cloning*). El análisis de ligamiento es una herramienta clásica de la genética molecular y en él se emplean marcadores altamente polimórficos distribuidos por el genoma (generalmente *short tandem repeats*, STR) –análisis global del genoma- y se analiza si alguno de estos marcadores se observa más frecuentemente en los individuos afectados, es decir, si su transmisión de generación en generación se relaciona con la aparición de la enfermedad (segregación). Estos resultados no indican que la variante detectada sea la que cause la enfermedad, sino que está asociada (en ligamiento) con la variante causal. El siguiente paso es analizar con mayor detalle la zona del genoma alrededor de la variante con otra serie de marcadores genéticos para identificar el gen y la variante causal, para lo que se utilizan los estudios de asociación.

El análisis de ligamiento ha sido muy útil para identificar los genes causales de muchas enfermedades monogénicas o que ejercen un efecto mayor en la susceptibilidad a una enfermedad, pero es menos probable que

tenga éxito si esta susceptibilidad tiene varios determinantes genéticos con efectos individuales pequeños (Vink y Boomsma, 2002; Rodríguez de Castro y cols., 2005; Elosua y cols., 2009).

1.7.2.2. Estudios de asociación.

El planteamiento de esta técnica consiste en comparar los valores de un determinado factor de riesgo entre dos grupos de sujetos, generalmente personas afectadas de un trastorno (**casos**) y personas sanas (**controles**). Si se observa una diferencia significativa entre los dos grupos, puede inferirse una asociación entre la patología, o rasgo estudiado, y el marcador en cuestión (Elosua y cols., 2009).

En estos estudios se suelen seleccionar genes candidatos, y dentro de esos genes se busca como marcadores genéticos a determinados polimorfismos, normalmente de tipo SNP, repartidos por todo el genoma.

1.7.2.3. Gen candidato

Los genes candidatos deben cumplir dos características principales. La primera es que exista una hipotética relación funcional entre el gen de interés y la etiología de la enfermedad.

La segunda característica es que los genes presenten variantes en su secuencia, que sean polimórficos en la población general.

En este sentido, los **SNPs** o polimorfismos de cambio de un solo nucleótido, son las variantes genéticas que se consideran como **las mejores candidatas a representar variantes de baja penetrancia** (Hirschhorn y cols., 2002).

1.7.2.4. Tipos de estudios de asociación.

Además de elegir el gen candidato, hay que determinar los polimorfismos genéticos candidatos dentro de ese gen. En este sentido existen dos estrategias para abordar el estudio: el método directo, y el método indirecto.

a) Método directo: estudios clásicos de asociación

En este método se escoge **un único polimorfismo** para el estudio, en base a la información previa de que puede tener relación funcional con la patología o rasgo estudiado. Se fundamenta en la **hipótesis a priori** de que **es la variante de baja penetrancia causal**.

Esta estrategia ha sido la más utilizada en los primeros estudios de asociación, debido a que antes de la secuenciación del genoma humano, el conocimiento de la distribución de los polimorfismos en los genes era limitado. Los polimorfismos conocidos dentro de cada gen eran pocos y no todos presentaban las características de frecuencia adecuadas para ser evaluados en un estudio de asociación (Hirschhorn y cols., 2002).

b) Método indirecto: estudios de asociación integral del genoma (*genome-wide association*; GWA)

Con esta estrategia no se evalúa un polimorfismo dentro de un gen, sino que **se valora un gen entero** como candidato, mediante una **batería de polimorfismos** que cubren la secuencia entera del gen, cuyo único requisito es que la frecuencia que presentan en la población sea la adecuada para el estudio de asociación. Los polimorfismos que se emplean como **marcadores genéticos**, no tienen repercusión funcional, pero se encuentran próximos a la variante causal y darán información sobre ella.

Este tipo de estudios, que se propusieron a mediados de los años noventa (Lander, 1996), no están basados en una hipótesis previa y se fundamentan en dos supuestos:

- a) Hay un número de variantes genéticas que capturan gran parte de la variabilidad genética común conocida en el genoma, y

- b) Las enfermedades raras o mendelianas están relacionadas con variantes genéticas poco frecuentes, mientras que las enfermedades crónicas están relacionadas con variantes genéticas frecuentes (hipótesis de enfermedad común en relación con una variante genética común).

Durante la siguiente década se desarrollaron los instrumentos para poder realizar este tipo de estudios. Se constituyó un consorcio que fue recogiendo en una **base de datos** las variantes genéticas por cambio de secuencia del ADN (polimorfismos de base única o *single nucleotide polymorphisms*, **SNPs**) identificadas (SNP Consortium) (Entrez SNP), donde actualmente se han registrado más de **diez millones de polimorfismos**. Pero ¿es necesario genotipar los diez millones de polimorfismos para estudiar la genética de las enfermedades complejas? Para responder a esta pregunta el estudio HapMap ha genotipado más de tres millones de estos polimorfismos y ha determinado el patrón de desequilibrio de ligamiento existente en el genoma en distintas poblaciones (dos SNPs que se encuentran físicamente cerca, tienden a transmitirse en el mismo haplotipo más frecuentemente de lo que lo harían por azar) (International Human Genome Mapping Consortium, 2001; International HapMap Consortium, 2007). Este estudio concluyó que al **genotipar unos 500.000 polimorfismos** (tagSNPs o SNPs marcadores) se captura gran parte de la variabilidad existente en el genoma (los tagSNPs nos dan información sobre los que tienen físicamente más cercanos y solamente es necesario analizar unos cuantos para obtener la información total). En paralelo,

diferentes compañías pusieron en marcha **plataformas para el genotipado masivo y chips** que permitían el genotipado de este número de variantes genéticas. En 2006 todo estaba listo para poner en marcha este tipo de estudios y responder a la pregunta de si variantes genéticas comunes explican una parte de la variabilidad de las enfermedades comunes (Manolio y cols., 2008).

c) Inconvenientes de los estudios de asociación

Existen dos inconvenientes fundamentales:

- **La asociación espúrea:** es un problema de estratificación de poblaciones que ocurre cuando los individuos escogidos en los grupos caso y control no pertenecen a una población homogénea, ya que la diferencia de frecuencias alélicas pueden deberse a causas que nada tienen que ver con el rasgo en estudio. Decimos entonces que estamos ante una asociación espúrea.

- **El fenómeno de desequilibrio de ligamiento** (linkage disequilibrium o LD): las variantes no se transmiten de forma aislada, sino en bloques.

De esta forma, la asociación entre una variante y un rasgo fenotípico puede deberse a tres causas distintas:

- Que exista una relación entre ellos (es el resultado que se persigue).
- Que la asociación sea espúrea debido a un problema de estratificación poblacional (falso positivo).
- Que la verdadera asociación del rasgo no sea con el SNP estudiado sino con otro que se sitúa en el mismo bloque de desequilibrio.

Existe discusión sobre qué tipo de estudio es el más adecuado, sin embargo, son **dos métodos complementarios**: los ***análisis de ligamiento*** son probablemente más eficaces para la localización inicial y sobre todo, para descartar zonas con rigor, mientras que los ***estudios de asociación*** son adecuados para estudiar con mayor precisión una zona previamente identificada con los estudios de ligamiento (Terwilliger y Göring, 2000)

2. JUSTIFICACIÓN

DEL

ESTUDIO

Más allá de los estudios de ligamiento que permitían fundamentalmente el hallazgo de genes únicos responsables de enfermedades que siguen un patrón de herencia mendeliano, la revolución científica que ha supuesto el Proyecto Genoma Humano, ha permitido realizar estudios de **asociación del genoma completo**. Gracias a éstos, ha comenzado en la comunidad científica el acercamiento causal a las enfermedades poligénicas tales como la diabetes, la enfermedad isquémica cardiaca o el cáncer, entre otras.

Estos estudios de asociación del genoma completo requieren, por su complejidad, muestras amplias que eviten sesgos de selección y permitan validar los resultados de manera estadísticamente significativa, y además, estudios independientes que reproduzcan los hallazgos, para que estos tengan validez.

El **melanoma cutáneo**, que representa la primera causa de mortalidad en el grupo de los cánceres cutáneos, se considera un tumor asociado a la exposición solar aguda intermitente y a los fototipos claros (I y II), dado que su incidencia se incrementa en este grupo de sujetos.

Se cree que la exposición a radiación UV, mediante un complejo mecanismo, es un factor de riesgo para el melanoma cutáneo, y que en los

sujetos de fototipo claro se produce una reducción en la protección frente a la radiación UV.

Se considera que un reducido porcentaje de melanomas cutáneos son hereditarios (es decir, asociados a un gen de alta penetrancia), y por tanto con fuerte patrón de agregación familiar. Éstos son debidos a mutaciones génicas en CDKN2A, principalmente, o en CDK4.

En este contexto, y gracias a los GWAs, se han detectado polimorfismos en genes de baja penetrancia dependientes de la pigmentación humana, asociados con un mayor riesgo de melanoma como MCR1, ASIP, TYR y TYRP1, entre otros.

Además, se ha encontrado un mayor riesgo de carcinoma de células basales y otros muchos cánceres asociados a polimorfismos genéticos en el gen de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT), pero no se ha estudiado la asociación entre melanoma y éste último.

Nuestro estudio se realiza con el propósito encontrar si existe asociación entre variantes genéticas recientemente descritas y la susceptibilidad a melanoma en la población española, o bien reproducir los hallazgos de otros estudios recientes, para apoyar, de forma necesaria su validez.

Los resultados de esta tesis nos ayudarán a entender, en clave genética, la predisposición a padecer melanoma, y las implicaciones en cuanto a diagnóstico precoz y prevención que pueden ser, en un futuro, importantes.

3. OBJETIVOS

1. Nos proponemos encontrar, en una muestra de población española, polimorfismos genéticos asociados a melanoma, que puedan ser:

- Previamente no relacionados con dicho cáncer.
- Previamente conocidos, lo cual aportaría reproductibilidad a estudios previos.

Ambos pueden ser asociados o no a los rasgos pigmentarios de las personas, lo cual permitiría entender mejor la relación patogénica entre genotipo-fenotipo y aparición de melanoma.

2. Comparar los hallazgos con controles sanos, y por tanto realizar un estudio de asociación.

3. Establecer la Odds Ratio para desarrollar cáncer de piel melanoma, en la población española, en portadores de las variantes genéticas estudiadas.

4. Añadir nuestros datos a los del estudio internacional del que formamos parte, y obtener, entre todos los componentes de dicho estudio, un tamaño muestral que permita obtener datos estadísticamente significativos.

4. MATERIAL

γ

MÉTODOS

4. 1. Población de estudio

El trabajo que presentamos forma parte de un estudio internacional multicéntrico de asociación de genoma completo en el que han participado Islandia, Suiza, Holanda, Austria, Italia y España.

4.1.1. Población española

La población española ha sido reclutada por el Departamento de Dermatología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” y por el Departamento de Dermatología del Instituto Valenciano de Oncología. El **tamaño muestral** ha sido de:

- **805 casos** de melanoma, seleccionados desde principios del año 2008 a finales del año 2009.

- **1.672 controles** (pacientes sanos) seleccionados de forma aleatoria desde principios del año 2004 a finales del año 2009, a partir de:
 - Acompañantes de pacientes que no fueran familiares de estos últimos.

- Pacientes que solicitaban asistencia sanitaria por motivos diferentes a cáncer.

4.1.2. Poblaciones extranjeras

El resto de participantes del estudio aportaron los siguientes tamaños muestrales:

- ❖ **Islandia:**
 - **Casos:** 591
 - **Controles:** 34.998
- ❖ **Suiza:**
 - **Casos:** 1.056
 - **Controles:** 2.631
- ❖ **Holanda:**
 - **Casos:** 736
 - **Controles:** 1.832
- ❖ **Austria:**
 - **Casos:** 152
 - **Controles:** 376

- ❖ **Italia:**
 - **Casos:** 560
 - **Controles:** 368

4. 2. Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Edad igual o superior a 18 años
- Consentimiento informado
- Casos:
 - Personas con antecedentes personales de melanoma y sin antecedentes personales o familiares de primer grado de otro cáncer.
 - Confirmación histológica de melanoma
- Controles: personas sin antecedentes familiares de primer grado, ni personales de ningún cáncer.

Criterios de exclusión

- Incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión.

4.3. Diseño del estudio

Se trata de un estudio multicéntrico analítico observacional de tipo caso-control.

Dicho estudio se realiza primeramente en la población islandesa para detectar qué polimorfismos genéticos se asocian a la presencia de melanoma y posteriormente, se replica el estudio en el resto de poblaciones: suiza, italiana, austriaca, holandesa y española.

En el caso de nuestra muestra española, se determinarán las frecuencias alélicas en el grupo de melanoma, y se compararán con las frecuencias alélicas del grupo de personas sanas.

A los casos y controles, una vez comprobado que cumplen los criterios de inclusión y no presentan criterios de exclusión, tras firmar un consentimiento informado de participación en el estudio, se les realizó un cuestionario cuyos datos podrán ser usados en estudios posteriores. Dicho cuestionario incluye:

- * Nombre y apellidos
- * Edad en el momento del cuestionario y en los casos, también la edad en el momento del diagnóstico de melanoma.
- * Sexo
- * Presencia de pecas

- Si o no
- * Número de nevus
 - 0-50
 - 50-100
 - >100
- * Color de ojos
 - Negro/marrón
 - Azul/gris
 - Verde
- * Color de pelo
 - Negro
 - Marrón
 - Rubio
 - Pelirrojo
- * Fototipo:
 - Siempre se quema y nunca se broncea
 - Casi siempre se quema y se broncea muy lentamente
 - Rara vez se quema y se broncea con frecuencia
 - Nunca se quema y siempre se broncea

Tras la realización de la encuesta se realiza la extracción de sangre y obtención de ADN, que será enviado al centro de referencia en Islandia donde se realizará el genotipado para determinar la presencia o no de las variantes previamente detectadas en la población islandesa.

Los datos anónimos se incluirán en una base de datos Excel para determinar mediante los test estadísticos adecuados la frecuencia de las diferentes variantes genéticas en los casos y controles, y la Odds Ratio de desarrollar melanoma en función de la presencia de estas variantes.

Por último, se combinarán las muestras de todos los países participantes para poder validar los resultados con mucho más poder estadístico.

4.3.1. Extracción de sangre

Tras la firma del consentimiento informado, se procede a realizar una extracción de 10 ml de sangre venosa periférica recogida con EDTA que inhibe la agregación plaquetaria al quelar el calcio de la sangre.

Procedimiento: Se coloca el brazo del paciente sobre una superficie plana y dura, y se le anuda un compresor de caucho por encima del codo para provocar la ingurgitación de las venas del brazo. A continuación se desinfecta la zona con un algodón impregnado en alcohol y se realiza la venopunción con un tubo de doble aguja (VACUTAINER®) para insertar posteriormente los tubos de vacío. Finalmente, se retira el compresor y portatubos, realizando una

fuerte compresión en la zona de punción mediante un algodón seco fijado con esparadrapo.

4.3.2. Extracción de ADN de las muestras

Se añade una solución de lisis de eritrocitos y se realizan dos centrifugaciones sucesivas eliminando el sobrenadante resultante de cada una de ellas para obtener un preparado que contiene a los leucocitos. Se añade a este último una solución de lisis leucocitaria y tras un proceso de incubación del preparado a 37° C durante una noche, se procede a realizar la precipitación de ADN. Figura 35.

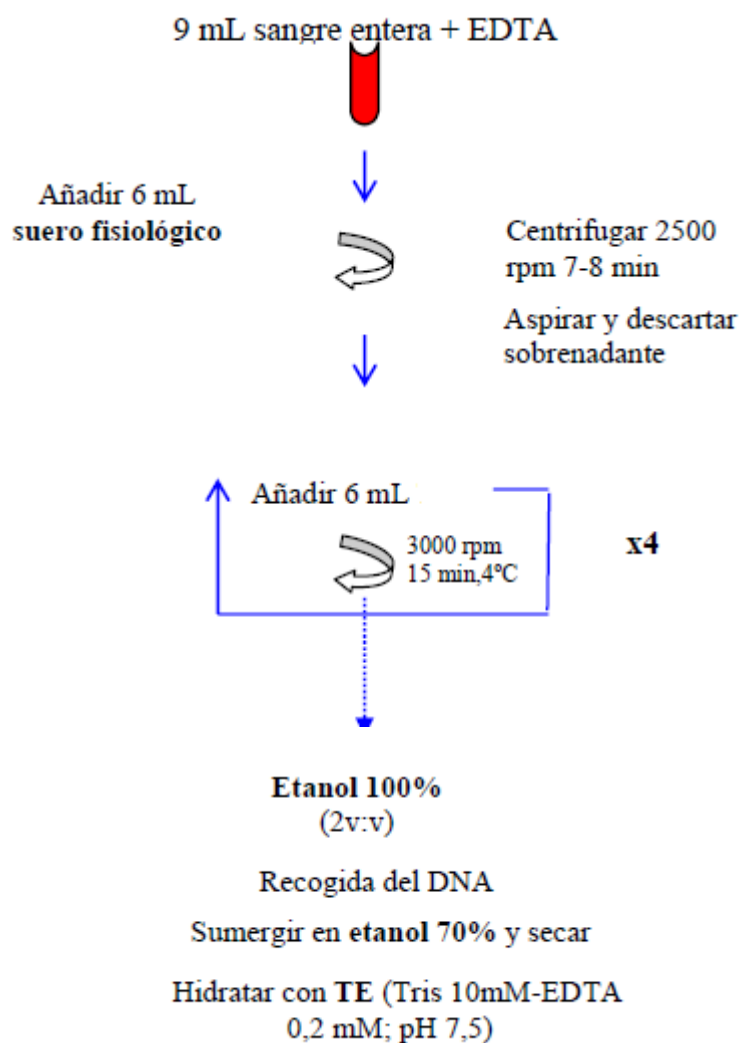


Figura 35: Extracción de ADN a partir de sangre entera.

4.3.3. Conservación de las muestras

La muestra obtenida se congela a -80°C .

4.4. Determinaciones y medidas del estudio, control de calidad, plan de análisis estadístico

4.4.1. Análisis genético de las muestras

Las variantes descubiertas en la muestra de la población islandesa en el estudio de asociación del genoma completo mediante la plataforma Illumina, con los chips HumanHap300 y HumanCNV370-duo se han replicado en una muestra de la población española (y en el resto de poblaciones participantes del estudio multicéntrico –Suiza, Austria, Holanda e Italia-) a través de la plataforma Centaurus.

Los SNPs del ensayo Centaurus fueron validados genotipando las muestras del HapMap CEU y comparando los genotipos obtenidos de nuestro estudio con los del HapMap CEU. Los ensayos mediante Centaurus fueron rechazados si mostraban discrepancias con el HapMap mayores al 1,5%.

El genotipado y la interpretación de los resultados son realizados de forma automática por un moderno aparataje tecnológico de PCR en tiempo real y procesamiento de las muestras en los biochips (Applied Biosystem®).

4.4.2. Análisis estadístico

Se ha calculado la Odds Ratio para cada alelo SNP asumiendo el modelo aditivo, esto es, se asume que el riesgo relativo del genotipo de una persona se obtiene teniendo en cuenta el riesgo que aporta cada uno de los dos alelos. Las frecuencias alélicas y la OR son expuestas para cada SNP marcador detectado. Los valores asociados de “p” fueron calculados con la tasa estándar de probabilidad estadística “chi-cuadrado”, que es el que se incluye en el paquete de software empleado NEMO y el adecuado para variables cuantitativas, como lo son las frecuencias alélicas. Los intervalos de confianza fueron calculados asumiendo que la estimación de OR tiene una distribución logarítmica normal.

4.5. Aspectos éticos y legales

- Se han cumplido los principios básicos de respeto por las personas, beneficencia y justicia.

- Se ha asegurado la confidencialidad de los datos obtenidos y se solicitó consentimiento informado (explicando de manera detallada el objetivo del estudio, su utilidad práctica y garantizando la confidencialidad), para la realización de la entrevista personal.

5. RESULTADOS

Mediante un estudio de asociación del genoma completo, utilizando la plataforma Illumina y Centaurus, tras usar microarrays de unos 320.000 y 500.000 Tag SNPs en la población islandesa, se detectaron dos polimorfismos asociados a la presencia de melanoma que no habían sido previamente detectados por el grupo multicéntrico del que formamos parte. Estos dos polimorfismos son:

- **SNP rs16891982 [G] en SLC45A2**
- **SNP rs401681 [C] en TERT-CLPTM1L**

5.1. SNP rs16891982 [G]

En la **población islandesa** para rs16891982 se obtuvo una OR de 1.58, esto es, los pacientes portadores de este polimorfismo, presentan 1.58 veces más riesgo de padecer melanoma que los pacientes no portadores de dicho polimorfismo. Sin embargo, no fue estadísticamente significativo, pues el valor de p fue de 0.11. En la tabla 9 se representan los tamaños muestrales, las frecuencias alélicas y los intervalos de confianza para estos valores.

En la **población española** que hemos recogido, de los 805 casos y los 1.672 controles, se ha obtenido mediante la plataforma Centaurus para rs16891982 una OR de 2.95. Éste resulta ser mayor que el obtenido para la

población islandesa, y más aún, con un poder estadístico muchísimo mayor pues el valor de p fue de 8.5×10^{-27} . En la tabla 10 se representan los datos referentes a la población española.

	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Controles	Casos	Controles			
Islandia	555	2.496	0.988	0.982	1.58	(0.90,2.76)	0.11

Tabla 9. Asociación de SLC45A2 rs16891982 con melanoma cutáneo en la población islandesa estudiada.

	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Controles	Casos	Controles			
España	805	1.672	0.935	0.829	2.95	(2.42,3.60)	8.5×10^{-27}

Tabla 10. Asociación de SLC45A2 rs16891982 con melanoma cutáneo en la población española estudiada.

En el **resto de los países** participantes se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Holanda:** de los 747 casos y 1.777 controles, se obtuvo para rs16891982 una OR de 2.56 con un valor “p” de 2.0×10^{-4} .
- **Suiza:** de los 1.061 casos y 541 controles, se obtuvo para rs16891982 una OR de 3.58 con un valor “p” de 1.4×10^{-7} .
- **Austria:** de los 152 casos y 376 controles, se obtuvo para rs16891982 una OR de 2.23 con un valor “p” de 7.7×10^{-2} .
- **Italia:** de los 560 casos y 367 controles, se obtuvo para rs16891982 una OR de 2.06 con un valor “p” de 7.7×10^{-5} (Tabla 11).

	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Control es	Casos	Controles			
Holanda	747	1.777	0.990	0.975	2.56	(1.56, 4.20)	2.0×10^{-4}
Suiza	1.061	541	0.988	0.957	3.58	(2.23, 5.75)	1.4×10^{-7}
Austria	152	376	0.984	0.964	2.23	(0.92, 5.42)	7.7×10^{-2}
Italia	560	367	0.949	0.900	2.06	(1.44, 2.95)	7.7×10^{-5}

Tabla 11. Asociación de SLC45A2 rs16891982 con melanoma cutáneo en la población holandesa, suiza, austriaca e italiana.

Por último, para rs16891982, teniendo en cuenta los valores de todos los países participantes en el estudio se obtiene una OR global de 2.95 con un valor p de 8.5×10^{-39} . La tabla 12 representa este último resultado junto con los restantes ya presentados.

	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Control es	Casos	Controles			
Islandia	555	2.496	0.988	0.982	1.58	(0.90,2.76)	0.11
España	805	1.672	0.935	0.829	2.95	(2.42,3.60)	8.5×10^{-27}
Holanda	747	1.777	0.990	0.975	2.56	(1.56, 4.20)	2.0×10^{-4}
Suiza	1.061	541	0.988	0.957	3.58	(2.23, 5.75)	1.4×10^{-7}
Austria	152	376	0.984	0.964	2.23	(0.92, 5.42)	7.7×10^{-2}
Italia	560	367	0.949	0.900	2.06	(1.44, 2.95)	7.7×10^{-5}
Global	3.880	7.189	-	-	2.95	(2.42, 3.60)	8.3×10^{-39}

Tabla 12. Asociación de SLC45A2 rs16891982 con melanoma cutáneo en las diferentes muestras poblacionales y resultados globales.

Puede observarse cómo, de todos los países incluidos en el estudio, donde más poder estadístico se obtiene es en España, pues el valor de “p” es el más bajo de todos con diferencia. No obstante, aunque en las muestras de Islandia y Austria, inicialmente los resultados no hayan sido significativamente estadísticos, el aumento de muestra que supone la participación de varios países arroja resultados tan rotundos como una OR de 2.95 con un valor de “p” de hasta 8.3×10^{-39} .

5.2. SNP rs401681 [C]

En la **población islandesa** para rs401681 se obtuvo una OR de 0.90. Esto supone, según el resultado, que los pacientes portadores de dicho polimorfismo tienen menor riesgo de padecer melanoma que los pacientes no portadores de dicho polimorfismo. En otras palabras, el SNP rs401681 [C] en TERT-CLPTM1L supone un factor protector frente a melanoma. Tampoco en esta ocasión fue estadísticamente significativo, pues el valor de “p” asociado es de 7.9×10^{-2} . En la tabla 13 se representan los tamaños muestrales, las frecuencias alélicas y los intervalos de confianza para estos valores.

En la **población española** hemos obtenido para rs401681 mediante la plataforma Centaurus la misma OR que en la población islandesa: 0.90,

también no estadísticamente significativo, pues “p” > 0,05. En la tabla 14 se representan los datos referentes a la población española.

rs401681	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Contro-les	Casos	Contro-les			
Islandia	591	34.998	0.52	0.55	0.90	(0.80, 1.01)	7.9 x 10 ⁻²

Tabla 13. Asociación de TERT-CLPTM1L rs401681 con melanoma cutáneo en la población islandesa estudiada.

rs401681	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Contro-les	Casos	Contro-les			
España	748	1.758	0.51	0.54	0.90	(0.80, 1.02)	9.4 x 10 ⁻²

Tabla 14. Asociación de TERT-CLPTM1L rs401681 con melanoma cutáneo en la muestra española.

En el **resto de los países** participantes se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Suiza**: de los 1.056 casos y 2.631 controles, se obtuvo para rs401681 una OR de 0.85 con un valor “p” de 1.2×10^{-3} .
- **Holanda**: de los 736 casos y 1.832 controles, se obtuvo para rs401681 una OR de 0.83 con un valor “p” de 3.9×10^{-3} .
- **Austria**: de los 152 casos y 376 controles, se obtuvo para rs401681 una OR de 0.98 con un valor “p” de 0.88.
- **Italia**: de los 560 casos y 368 controles, se obtuvo para rs401681 una OR de 0.74 con un valor “p” de 1.2×10^{-3} . Tabla 15.

rs401681	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Contro-les	Casos	Contro-les			
Suiza	1.056	2.631	0.49	0.54	0.85	(0.77, 0.94)	1.2×10^{-2}
Holanda	736	1.832	0.53	0.57	0.83	(0.73, 0.94)	3.9×10^{-3}
Austria	152	376	0.53	0.53	0.98	(0.75, 1.27)	0.88
Italia	560	368	0.49	0.56	0.74	(0.62, 0.89)	1.2×10^{-3}

Tabla 15. Asociación de TERT-CLPTM1L rs401681 con melanoma cutáneo en la población holandesa, suiza, austriaca e italiana.

Por último, para rs401681, teniendo en cuenta los valores de todos los países participantes en el estudio, se obtiene una OR global de 0.86 con un valor “p” de 5.0×10^{-8} . La tabla 16 representa este último resultado junto con los restantes, arriba expuestos.

rs401681	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Contro-les	Casos	Contro-les			
Islandia	591	34.998	0.52	0.55	0.90	(0.80, 1.01)	7.9×10^{-2}
España	748	1.758	0.51	0.54	0.90	(0.80, 1.02)	9.4×10^{-2}
Suiza	1.056	2.631	0.49	0.54	0.85	(0.77, 0.94)	1.2×10^{-2}
Holanda	736	1.832	0.53	0.57	0.83	(0.73, 0.94)	3.9×10^{-3}
Austria	152	376	0.53	0.53	0.98	(0.75, 1.27)	0.88
Italia	560	368	0.49	0.56	0.74	(0.62, 0.89)	1.2×10^{-3}
Global	3.843	41.963	-	-	0.86	(0.81, 0.91)	5.0×10^{-8}

Tabla 16. Asociación de TERT-CLPTM1L rs401681 con melanoma cutáneo en las diferentes muestras poblacionales y resultados globales.

6. *DISCUSIÓN*

En las últimas dos décadas, los **avances en la investigación genética del cáncer** han permitido caracterizar mutaciones en genes que predisponen a determinados tipos de cáncer con un **patrón de herencia mendeliano**. Ejemplos de genes de predisposición a cáncer son los genes BRCA1 y BRCA2 en el cáncer hereditario de mama y ovario, o el gen APC en la poliposis adenomatosa familiar. La **frecuencia** de estas mutaciones es ***muy baja en la población general*** (0,001 de media), pero cuando aparecen, el **riesgo que confieren a padecer cáncer es *muy alto***. De todo ello han derivado guías de actuación en cuanto a las pruebas genéticas, estrategias de vigilancia y prevención de dichos cánceres, que se han incorporado a la práctica clínica oncológica (Stadler y cols., 2010).

Un mayor conocimiento del genoma humano y los avances en la tecnología del genotipado, han hecho posibles los **estudios de asociación del genoma completo** (GWAs –genome wide association studies–) que, en los últimos 4-5 años, han identificado variantes genéticas de susceptibilidad para multitud de enfermedades comunes multifactoriales y poligénicas, incluido el cáncer. Estas variantes genéticas, descubiertas gracias a los GWAs, son **variantes de baja penetrancia**, muy **comunes** en la población general, siendo el **riesgo** que confieren a padecer la enfermedad ***bajo o moderado*** (Bodmer y Bonilla, 2008) (Figura 36).

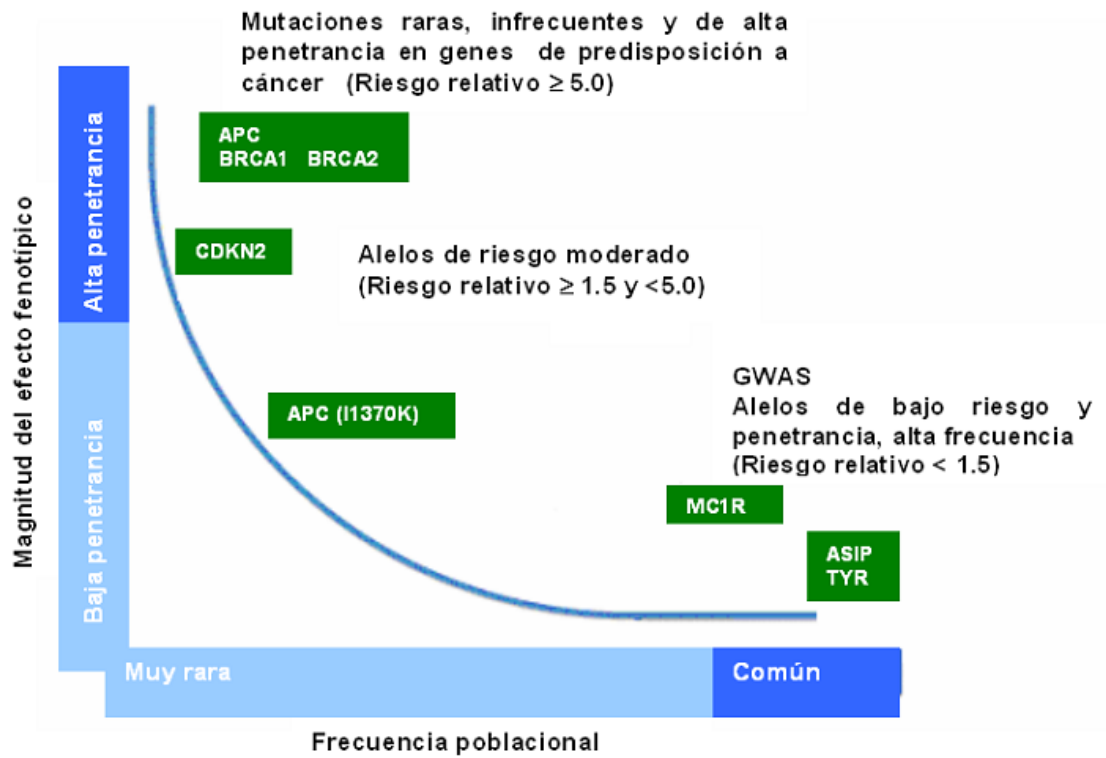


Figura 36: Grado de efecto fenotípico y frecuencia de presentación de algunos SNPs en la población. Modificado de Stadler y cols., 2010.

Aunque el **99,9% del ADN es idéntico** entre diferentes individuos, el gran tamaño del genoma humano (3,2 millones de pares de bases), hace que esta **pequeña discrepancia** entre individuos suponga **millones de variaciones posibles** (Guo y Lange, 2000). Las variaciones más comunes son los polimorfismos de un solo nucleótido (**SNPs**) (Luo y cols., 2010). Los **GWAs** comparan las frecuencias alélicas entre los individuos con una enfermedad (casos) y los individuos sin enfermedad (controles). Al determinar que los SNPs

son más (o menos) frecuentes en individuos con enfermedad, pueden ser identificadas regiones genómicas asociadas a la enfermedad en cuestión, y se puede realizar una estimación estadística del nivel de aumento (o disminución) de riesgo asociado a cada SNP (Elosua y cols., 2009). Los GWAs aprovechan el hecho de que bloques de ADN (haplotipos) y alelos adyacentes tienden a heredarse juntos de forma no independiente, de generación en generación. Esta asociación no aleatoria de alelos en loci cercanos (**desequilibrio de ligamiento**) permite que ciertos SNPs sirvan como marcadores o *TagSNPs* de otros SNPs cercanos. El uso de estos marcadores SNPs, permite reducir el número de SNPs que necesitan ser genotipados, para caracterizar la variación genómica individual, a unos 500.000 (Manolio y cols., 2008).

El ADN de cientos o miles de casos y controles se analiza con chips disponibles comercialmente (**microarrays de oligonucleótidos o chips**) que permiten el análisis de alto rendimiento de hasta un millón de SNPs en una reacción. Para que los costes se minimizen, el estudio se diseña en varias etapas más rentables, como la que se muestra en la figura 37, donde los SNPs significativos que se han detectado en la primera fase, son los que se incluyen para ser replicados en las siguientes fases (Stadler y cols., 2010).

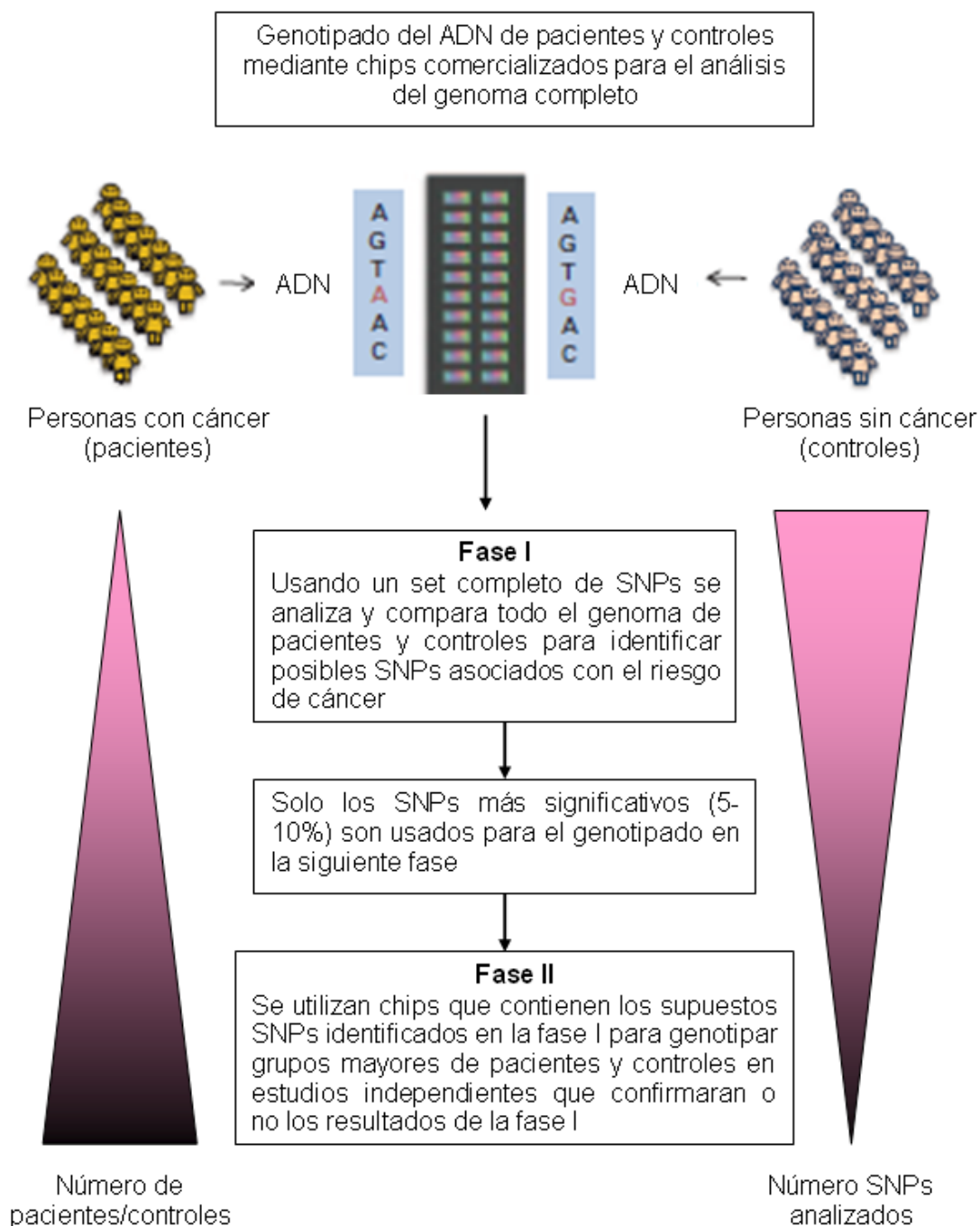


Figura 37: Diseño de un GWAs típico de susceptibilidad a cáncer. Elaboración propia a partir del diseño de Stadler y cols., 2010.

En el caso del melanoma cutáneo son dos los **genes de alta penetrancia** los que se han descubierto gracias a los *estudios de ligamiento*:

1) El **gen CDKN2A**, cuyas mutaciones germinales están presentes en el 40% de las familias que padecen melanoma con agregación familiar (Meyle y Guldberg, 2009) y en el 2% de los melanomas esporádicos (Chin, 2003).

2) Y el **gen CDK4**, cuyas mutaciones germinales se encuentran en el 2% de dichas familias.

El grado de penetrancia de estas mutaciones para el desarrollo de melanoma es alto, y ha sido estimado en 0,30 (IC 95 %: 0,12-0,62) a los 50 años de edad, y de 0,67 (IC 95 %: 0,31-0,96) a los 80 años de edad, es decir, la ***probabilidad de padecer la enfermedad*** en los sujetos con mutaciones germinales en *CDKN2A* o *CDK4* ronda el 30% y el 67% a los 50 y 80 años, respectivamente (Goldstein y cols., 2006).

La búsqueda de variantes genéticas polimórficas asociadas a melanoma en **genes de baja penetrancia** comenzó con los ***estudios genéticos sobre la pigmentación humana normal***. Los genes involucrados en este proceso fueron inicialmente identificados a través de estudios genómicos comparativos de las mutaciones en relación con el color de la piel del ratón, y por la caracterización molecular de las enfermedades genéticas hipopigmentarias como el albinismo oculocutáneo (Sturm, 2001). Fue así como se intuyó,

inicialmente, que MCR1, TYR, OCA2, TYRP-1 y SLC45A2 podían ser genes involucrados en la pigmentación humana normal.

De esta forma, a partir de la lista de los genes implicados en el color del pelaje del ratón, proporcionada por el Centro Internacional de Albinismo, se supo que las mutaciones en 127 genes afectaban a la pigmentación en ratones, de los cuales, 68 genes homólogos humanos representaron candidatos prometedores para ser genes implicados en las diferencias pigmentarias humanas, y de ellos, hasta el año 2007, 29 genes fueron asociados con anomalías raras y síndromes de alteración de la pigmentación, como el albinismo y el síndrome de Hermansky-Pudlak; y sólo 6 genes fueron asociados con la pigmentación humana normal: **MCR1**, **OCA2**, **SLC24A5**, **TYR**, **ASIP** y **SLC45A2**. En el año 2007, Sulem y cols., publican el primer GWAs aplicado a la detección de determinantes genéticos de la pigmentación humana (Sulem y cols., 2007). Desde entonces hasta nuestros días, los GWAS han permitido describir una larga lista de genes implicados en la pigmentación humana y que están enumerados en la tabla 17.

En cuanto a los estudios que han intentado describir **genes relacionados con una mayor susceptibilidad a melanoma**, únicamente han arrojado resultados concluyentes aquellos que han relacionado dicha susceptibilidad con los **genes implicados en la pigmentación humana normal** (Sulem y cols., 2007; Gudbjartsson y cols., 2008; Brown y cols., 2008; Guedj y cols., 2008; Fernández y cols., 2008; Nan y cols., 2009; Udayakumar y

Tsao, 2009), en contra de los contradictorios resultados encontrados con otro tipo de genes (*VDR*, genes de reparación del DNA, *MDM2*, *EFG*, *GSTM1* o *GSTT1*, *B-RAF* y *p53*) (Jackson y cols., 2005; Mössner y cols., 2007; Casula y cols., 2009; Randerson-Moor y cols., 2009; Mocellin y Nitti, 2008). Con respecto a los primeros, los estudios iniciales fueron estudios clásicos de ligamiento genético, en los que se tomaban como candidatos a los anteriormente citados genes relacionados con la pigmentación humana normal. Con anterioridad al año 2007, solo ciertos polimorfismos genéticos de *MCR1* pudieron relacionarse de forma concluyente con el melanoma cutáneo, incluso de forma independiente a la presencia del fenotipo RHC, con riesgos relativos de 2 a 3,9 para melanoma (Box y cols, 2001).

Proteína	Gen	Cromosoma
SLC45A2	MATP	5
IRF4	IRF4	6
EXOC2	EXOC2	6
TYRP-1	TYRP-1	9
TYR	TYR	11
TPCN2	TPCN2	11
KILTG	KILTG	12
SLC24A4	SLC24A4	14
OCA2	P	15
SLC24A5	NCKX5	15
MCR1	MCR1	16
ASIP	Agouti	20

Tabla 17: Genes cuyos polimorfismos tienen influencia en la pigmentación cutánea basal y otros rasgos fenotípicos como el color de ojos, de pelo o el

fototipo. Elaboración propia a partir de a: Sturm y cols., 2001; Sturm, 2006; Sulem y cols., 2007; Parra, 2007; Sturm, 2009).

Y fue la revolución científica aportada por los GWAs los que, a partir del año 2008, permitieron relacionar en grandes estudios poblacionales, a otros genes de la pigmentación humana normal con el melanoma cutáneo:

a) ASIP y HA. Se han encontrado determinados polimorfismos en ASIP y el haplotipo cercano a este último (HA), que confieren mayor riesgo de melanoma en tres estudios, con los siguientes riesgos relativos:

- OR de 1.45 con IC (1.29, 1.64); $p=1.2 \times 10^{-9}$. Estudio realizado con 2.121 casos y 40.000 controles (Gudbjartsson y cols, 2008).

- OR de 1,68 con IC (1.18, 2.39). Estudio realizado con 218 casos y 870 controles (Nan y cols, 2009 -en dicho artículo no se muestra la “p” obtenida-).

- OR de 1,72 con IC (1.53, 2.01); $p=1 \times 10^{-15}$. Estudio realizado en 2.019 casos y 2.105 controles (Brown y cols, 2008).

b) TYR y TYRP1. Tras el gen ASIP, el segundo y tercero en OR para riesgo incrementado de melanoma es:

- **TYR** con OR de 1,21 para el SNP codificante y no sinónimo rs1126809 (IC (1.13, 1.30); $p = 2.8 \times 10^{-7}$) (Gudbjartsson y cols, 2008).
- **TYRP1** con OR de 1,15 para el SNP no codificante rs1408799 (IC (1.06, 1.24); $p = 0.00043$) (Gudbjartsson y cols, 2008).

c) SLC45A2. Finalmente, el gen **SLC45A2**, localizado en el cromosoma 5p13.3, contiene siete exones y codifica una proteína de 530 aminoácidos, que se sitúa en la membrana melanosómica actuando como transportador hidrógeno/sodio, dirigiendo probablemente el tráfico de proteínas y otras sustancias al melanosoma (Graft y cols., 2005). Las mutaciones de este gen producen el *albinismo oculocutáneo tipo IV*, pues no se produce el correcto procesamiento de la tirosinasa, ni su translocación tras pasar por el aparato de Golgi. Hay **dos estudios**, publicados ambos en 2008, uno en población francesa (1019 casos y 1466 controles) (Guedj y cols., 2008) y otro en población española (131 casos y 245 controles) (Fernández y cols., 2008) en los que se encuentra un **efecto significativamente protector** del polimorfismo **Phe374Leu** rs16891982 frente al melanoma con OR de 0,35 (CI = (0.26–0.46) ($p = 2.12.10^{15}$) y 0,41 (CI = 0.24–0.70) ($p = 0.008$), respectivamente.

No obstante, si tenemos en cuenta que el alelo 374Leu está asociado significativamente a la presencia de pelo, piel y ojos oscuros (Graft y cols, 2005) y que más del 90% de los genes de descendencia europea llevan el alelo Phe374 (Jackson, 2006), que es el asociado a pigmentación clara, sería más razonable estudiar la **asociación del polimorfismo Leu374Phe** (pues es la variante de riesgo más común) **con la aparición de melanoma cutáneo**. Esto último es lo que se ha hecho en nuestro estudio (en los dos primeros estudios se ha calculado la frecuencia del alelo menor en casos y en controles, y es lo que se ha comparado; mientras que en el nuestro se ha calculado la frecuencia del alelo más frecuente en los casos y los controles, y se ha comparado). Si se realiza de esta forma, se asocia con un aumento de riesgo de melanoma con OR de 2,95 (IC = 2.42, 3.60) "p" = 8.5×10^{-27} . En la tabla 18 se muestran los datos de los dos estudios previos para SCL45A2, y del que presentamos, teniendo en cuenta los valores de la muestra española y los del total del estudio multicéntrico en el que participamos (Stacey y cols., 2009).

Obsérvese que de los tres estudios, la mayor significación estadística se consigue en nuestro grupo de trabajo, tanto teniendo en cuenta la muestra española ($p = 8.5 \times 10^{-27}$), como la global ($p = 8.3 \times 10^{-39}$), y con un mayor tamaño muestral, aspecto fundamental en los GWAs para obtener suficiente poder estadístico (Stadler y cols., 2010).

SCL45A2 rs16891982	Número		OR	IC 95%	P
	Casos	Controles			
Guedj y cols, 2008 Leu374	1019	1.466	0.35	(0.26, 0.46)	2.12 x10 ⁻¹⁵
Fernández y cols, 2008 Leu374	131	245	0,41	(0.24, 0.70)	0.008
Stacey y cols, 2009 <u>España</u> 374Phe	805	1.672	2.95	(2.42,3.60)	8.5 x 10 ⁻²⁷
Stacey y cols, 2009 <u>Global</u> 374Phe	3.880	7.189	2.95	(2.42, 3.60)	8.3 x 10⁻³⁹

Tabla 18. Resultados de las publicaciones sobre la asociación de SCL45A2 y melanoma cutáneo.

A su vez, si comparamos los resultados de los distintos países participantes en el trabajo de Stacey y cols., tabla 19, España sigue siendo la muestra en la que se obtiene el mayor poder estadístico ($p=8.5 \times 10^{-27}$). Islandia es, sin embargo, donde se obtiene una menor OR que en el resto de países, así como también se encontró, por el mismo grupo de trabajo, una OR menor en Islandia para riesgo de melanoma asociado a otras variantes genéticas relacionadas con la pigmentación normal (ASIP y TYR). Esto puede

deberse a la influencia de una menor exposición solar entre los islandeses (Gudbjartsson y cols., 2008).

	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Control es	Casos	Controles			
Islandia	555	2.496	0.988	0.982	1.58	(0.90,2.76)	0.11
España	805	1.672	0.935	0.829	2.95	(2.42,3.60)	8.5 x 10 ⁻²⁷
Holanda	747	1.777	0.990	0.975	2.56	(1.56, 4.20)	2.0 x 10 ⁻⁴
Suiza	1.061	541	0.988	0.957	3.58	(2.23, 5.75)	1.4 x 10 ⁻⁷
Austria	152	376	0.984	0.964	2.23	(0.92, 5.42)	7.7 x 10 ⁻²
Italia	560	367	0.949	0.900	2.06	(1.44, 2.95)	7.7 x 10 ⁻⁵
Global	3.880	7.189	-	-	2.95	(2.42, 3.60)	8.3 x 10⁻³⁹

Tabla 19. SCL45A2 y melanoma cutáneo (Stacey y cols, 2009).

Por último, se ha realizado el **primer estudio** en el que se confirma la asociación entre el polimorfismo genético **rs401681** en el locus **TERT-CLPTM1L** y el melanoma cutáneo.

El **rs401681** se localiza en el cromosoma 5p15.33, en un intrón del gen CLPTM1L, y reside, a su vez, en un bloque de desequilibrio de ligamiento que contiene dicho gen, CLPTM1L (gen relacionado con la proteína CRR9 de resistencia a cisplatino), y el gen TERT (telomerasa humana transcriptasa inversa).

CLPTM1L es una proteína transmembrana que se presenta en tejidos normales y malignos de la piel, pulmón, mama, ovario y cérvix. La expresión de CLPTM1L se ha relacionado con una mayor sensibilidad de las células de cáncer de ovario a la apoptosis inducida por cisplatino (Yamamoto y cols., 2001).

El **gen TERT** codifica la subunidad catalítica del complejo ribonucleoproteico telomerasa. Éste posee actividad transcriptasa inversa (puede sintetizar ADN a partir de una secuencia de ARN que ella misma porta), y su principal función es catalizar la adición de novo de secuencias teloméricas repetitivas en los extremos finales cromosómicos, y por tanto, contrarrestar la senescencia celular dependiente del acortamiento de los telómeros que ocurre en cada replicación celular, ya que cuando los telómeros llegan a un límite de acortamiento se activa la apoptosis que lleva a la muerte celular programada. Muchas células cancerígenas reactivan la actividad telomerasa, favoreciendo la proliferación de un clon maligno (Blackburn, 2001).

Los **GWAs** han permitido detectar varios **polimorfismos genéticos de baja penetrancia asociadas a un mayor riesgo de varios tipos de cáncer**, como los de próstata, mama, colon y recto, pulmón, vejiga urinaria y piel. Y curiosamente, en la mayoría de los casos las variantes genéticas reportadas parecen ser específicas para el tipo concreto de cáncer en estudio. Esta especificidad tisular se cumple incluso para la región del cromosoma 8q24, donde se han detectado varias variantes independientes que se asocian con riesgo de cáncer de próstata, mama y vejiga (Rafnar y cols., 2009). Sólo una de las variantes (rs6983267 en 8q24) del cáncer de próstata se ha demostrado asociada también con el riesgo de otro cáncer, el cáncer colorrectal (Tomlinson y cols., 2007).

En este contexto, en nuestro grupo de trabajo, se detectó una nueva variante previamente desconocida, **rs401681**, asociada inicialmente al **carcinoma de células basales** de la piel (OR = 1.25, "p" = 3.7×10^{-12}). Al conocerse que estaba localizado en el locus TERT-CLPTM1L, y dada la relevancia de esta región genómica en la biología del cáncer por las implicaciones funcionales de dicho locus en cuanto a los mecanismos de supervivencia y senescencia celular, como se ha explicado anteriormente, se demuestra, a principios del año 2009, en un grupo de 30.000 casos de cáncer y 40.000 controles sanos, que esta misma variante se asocia también con un mayor riesgo de **cáncer de pulmón** (OR = 1.15, "p" = 7.2×10^{-8}), **próstata**, **vejiga y cérvix** (ORs = 1.07-1.31, p= 4×10^{-4}) y se presentan datos

preliminares de que rs401681 confiere **protección frente a melanoma** (OR = 0.88,"p" = 8.0×10^{-4}) (Rafnar y cols., 2009).

Meses más tarde, en agosto del 2009, presentamos los datos confirmativos de dicha **asociación protectora entre rs401681 y melanoma** (OR = 0.86,"p" = 5×10^{-8}) (Stacey y cols., 2009). Tabla 20.

rs401681	Número		Frecuencia		OR	IC 95%	P
	Casos	Contro-les	Casos	Contro-les			
Islandia	591	34.998	0.52	0.55	0.90	(0.80, 1.01)	7.9×10^{-2}
España	748	1.758	0.51	0.54	0.90	(0.80, 1.02)	9.4×10^{-2}
Suiza	1.056	2.631	0.49	0.54	0.85	(0.77, 0.94)	1.2×10^{-2}
Holanda	736	1.832	0.53	0.57	0.83	(0.73, 0.94)	3.9×10^{-3}
Austria	152	376	0.53	0.53	0.98	(0.75, 1.27)	0.88
Italia	560	368	0.49	0.56	0.74	(0.62, 0.89)	1.2×10^{-3}
Global	3.843	41.963	-	-	0.86	(0.81, 0.91)	5.0×10^{-8}

Tabla 20. Asociación de TERT-CLPTM1L rs401681 con melanoma cutáneo en las diferentes muestras poblacionales y resultados globales (Stacey y cols., 2009).

La causa de que rs401681 sea un polimorfismo de riesgo para unos cánceres, incluido el de células basales de la piel, y de protección para melanoma, está aún por descubrir.

En un estudio publicado sobre la longitud de los telómeros en individuos con cáncer de piel, Han y cols. han demostrado que los **telómeros cortos** están asociados a **carcinoma basocelular** (y según otros estudios a cáncer de pulmón, cabeza y cuello, vejiga, riñón, esófago, mama y linfoma –Rafnar y cols., 2009-), mientras que los **telómeros largos** están asociados con un mayor riesgo de **melanoma**.

Se ha postulado que el desarrollo de distintos tipos de cáncer de piel en función de la longitud de los telómeros, podría deberse a las diferentes características proliferativas de los dos tipos de células en las que se desarrollan el carcinoma basocelular y el melanoma (células de la capa basal y melanocitos, respectivamente), y de cómo se comportan ante el acortamiento progresivo de los telómeros (Han y cols., 2009):

- Los **melanocitos** poseen una menor diferenciación que los queratinocitos y ante el acortamiento de los telómeros, tienen más tendencia a entrar en senescencia que en apoptosis, tal vez debido a una menor concentración de proteínas anti-apoptóticas como bcl-2.

Cuando los melanocitos proliferan, para lo cual es preciso que los telómeros sean más largos que cortos, dan lugar a los nevus, cuyo número está asociado con un mayor riesgo de melanoma. Por el contrario, el acortamiento de los telómeros:

- Limita la proliferación melanocitaria, y por tanto está asociado a un menor número y tamaño de los nevus, y por ende, de melanoma.

 - Lleva al melanocito a entrar en senescencia, en estado G1 del ciclo celular de forma irreversible y, al no poder proliferar, se impide la acumulación de mutaciones oncogénicas y, por tanto, la consiguiente transformación maligna.
- Los **queratinocitos** tienen una mayor tendencia a la diferenciación que los melanocitos y su capacidad de proliferación fisiológica es mucho mayor, pues la piel se renueva continuamente y, por ello, a su vez, poseen mayor potencial apoptótico.

En los queratinocitos basales, el alto índice de proliferación celular, unido a un continuo daño solar que se incrementa de forma acumulativa a lo largo de las divisiones, aumentan la inestabilidad

telomérica y los reordenamientos cromosómicos. Todo ello lleva a que el acortamiento relativo de los telómeros (que ocurre por las continuas divisiones celulares) esté asociado con un mayor riesgo de transformación maligna.

Vemos pues cómo los **GWAs** son herramientas poderosas que están mejorando nuestra comprensión de la genética del cáncer en general, y del melanoma en particular, y conducirán a la identificación de **nuevas vías de carcinogénesis**.

Tal vez una de las ventajas más importantes de los GWAs es el uso de un **enfoque agnóstico** donde pueden ser **identificados nuevos genes** que antes no se creían implicados en la susceptibilidad al cáncer, como es el caso del **gen TERT**. Aunque aún quedan por descubrir los cambios funcionales en los genes físicamente cercanos a los SNPs de riesgo implicados en la susceptibilidad al cáncer, para que de ello puedan derivarse estrategias preventivas y terapéuticas (Stadler y cols., 2010).

De momento no hay suficiente evidencia científica para concluir que los perfiles genómicos son útiles en la medición del riesgo genético para las enfermedades comunes, o el desarrollo de recomendaciones personalizadas para la prevención de enfermedades (Janssens y cols., 2008). Antes de la incorporación de las variantes genéticas en la evaluación individual del riesgo de cáncer, los resultados de los **GWAs deberán ser validados por estudios**

prospectivos en poblaciones heterogéneas. La importancia de los estudios prospectivos viene dada por varias razones:

- Los estudios prospectivos pueden tener en cuenta los factores medioambientales, y también puede identificar asociaciones con la mortalidad específica de la enfermedad o fenotipo clínico más agresivo.
- Los estudios prospectivos permiten una mejor estimación del riesgo absoluto, la sensibilidad, especificidad, así como el valor predictivo positivo y negativo, que tienen en cuenta la incidencia del cáncer en la población de estudio. Estas medidas son más útiles clínicamente que las ORs a partir de estudios retrospectivos (Jakobsdottir y cols., 2009).

7. Conclusiones

1. Se ha realizado un estudio de asociación del genoma completo (**GWAs**) en población española, tecnología disponible en esta década, que gracias a la aportación del Proyecto Genoma Humano y al Proyecto HapMap, permite **conocer el componente poligénico de una enfermedad compleja, el melanoma, responsable del 90% de las muertes por cáncer de piel.**
2. En este estudio de asociación del genoma completo, con un tamaño muestral suficiente, se ha encontrado una asociación estadísticamente muy significativa **entre el polimorfismo rs16891982 de SCL45A2 y el riesgo de desarrollar melanoma cutáneo.**
3. Se ha encontrado por primera vez **asociación protectora entre rs401681 en el locus TERT-CLPTM1L y melanoma cutáneo.**
4. **rs401681** es el único polimorfismo que, hasta el momento, se asocia con un incremento de riesgo de 6 tumores diferentes, y protección frente al melanoma.
5. **rs401681** constituye la primera variante genética asociada a melanoma cutáneo que está localizada en un gen no relacionado con la pigmentación cutánea.
6. La investigación sobre asociación de melanoma y características fenotípicas está pasando a integrarse dentro de la búsqueda de genes de susceptibilidad

que modulan la respuesta de los sujetos frente a los agentes dañinos, modificando la probabilidad de desarrollar este tumor.

7. Este estudio de asociación de genoma completo ha permitido abrir una línea de avance en la identificación de los mecanismos biológicos del melanoma.

8. Bibliografía

1. Abdel-Malek ZA, Knittel J, Kadekaro AL, Swope VB, Starner R. The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes-a shift in paradigm. *Photochem Photobiol* 2008; 84(2):501-8.
2. Aceituno-Madera P, Buendía-Eisman A, Arias-Santiago S, Serrano-Ortega S. Evolución de la incidencia del cáncer de piel en el período 1978-2002. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101(1):39-46.
3. Akkiz H, Sümbül AT, Bayram S, Bekar A, Akgöllü E. MDM2 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to hepatocellular carcinoma in Turkish population. *Cancer Epidemiol* 2010; 34(4):448-52.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Ediciones Omega; 2004.
5. Ando H, Niki Y, Yoshida M, Ito M, Akiyama K, Kim JH, et al. Keratinocytes in culture accumulate phagocytosed melanosomes in the perinuclear area. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23(1):129-33.
6. Asin M, Bañuls R, Berrocal A, Giménez J, González M, Guillén C, et al. *Guía de prevención y tratamiento del melanoma*. Valencia: Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat; 2006.
7. Aspengren S, Hedberg D, Sköld HN, Wallin M. New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009; 272:245-302.
8. Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K, et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer* 1996; 73(12):1605-11.
9. Bataille V, Kato BS, Falchi M, Gardner J, Kimura M, Lens M, et al. Nevus size and number are associated with telomere length and represent potential markers of a decreased senescence in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(7):1499-502.

10. Bataille V, Snieder H, MacGregor AJ, Sasieni P, Spector TD. Genetics of risk factors for melanoma: an adult twin study of nevi and freckles. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(6):457-63.
11. Bauer J, Büttner P, Wiecker TS, Luther H, Garbe C. Risk factors of incident melanocytic nevi: a longitudinal study in a cohort of 1,232 young German children. *Int J Cancer* 2005; 115(1):121-6.
12. Berneburg M, Surber C. Children and sun protection. *Br J Dermatol* 2009; 161 Suppl 3:33-9.
13. Berwick M, Wiggins C. The current epidemiology of cutaneous malignant melanoma. *Front Biosci* 2006; 11:1244-54.
14. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, et al. Geographical Variation in the Penetrance of CDKN2A Mutations for Melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(12):894-903.
15. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106(6):661-73.
16. Bloethner S, Scherer D, Drechsel M, Hemminki K, Kumar R. Malignant melanoma-a genetic overview. *Actas Dermosifiliogr* 2009; 100 Suppl 1:38-51.
17. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 2008; 40(6):695-701.
18. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328(6131):614-6.
19. Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatología*. Madrid: Ediciones Elsevier; 2004.
20. Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, Gobin E, Dorange G, Rougier N, et al. Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. *PLoS One* 2009; 4(8):e6528.

21. Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* 2001; 69(4):765-73.
22. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(22):10124-8.
23. Brown KM, Macgregor S, Montgomery GW, Craig DW, Zhao ZZ, Iyadurai K, et al. Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40(7):838-40.
24. Cabrera Morales CM, López-Nevot MA. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología (Barc)* 2006; 29:25-32.
25. Capasso M, Ayala F, Avvisati RA, Russo R, Gambale A, Mozzillo N, et al. MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro in cutaneous melanoma: association between SNP309 GG genotype and tumor Breslow thickness. *J Hum Genet* 2010; 55(8):518-24.
26. Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2(2):91-9.
27. Cariacedo, A. El proyecto HapMap. *GH Continuada* 2007; 6:201-4.
28. Carlson JA, Linette GP, Aplin A, Ng B, Slominski A. Melanocyte receptors: clinical implications and therapeutic relevance. *Dermatol Clin* 2007; 25(4):541-57.
29. Casula M, Alaibac M, Pizzichetta MA, Bono R, Ascierto PA, Stanganelli I, et al. Role of the EGF +61A>G polymorphism in melanoma pathogenesis: an experience on a large series of Italian cases and controls. *BMC Dermatol* 2009; 9:7.
30. Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(8):559-70.

31. Coelho SG, Choi W, Brenner M, Miyamura Y, Yamaguchi Y, Wolber R, et al. Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2009; 14(1):32-5.
32. Cooper RS. Gene-environment interactions and the etiology of common complex disease. *Ann Intern Med* 2003; 139(5 Pt 2):437-40.
33. Cormier JN, Xing Y, Ding M, Lee JE, Mansfield PF, Gershenwald JE, et al. Ethnic differences among patients with cutaneous melanoma. *Arch Intern Med* 2006; 166(17):1907-14.
34. Cullis CA. The use of DNA polymorphisms in genetic mapping. *Genet Eng (N Y)*; 24:179-89.
35. Czarnecki D, Meehan CJ. Is the incidence of malignant melanoma decreasing in young Australians? *J Am Acad Dermatol* 2000; 42(4):672-4.
36. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001; 29(2):229-32.
37. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 2002; 146 Suppl 61:1-6.
38. Diffey B. Sunscreens: expectation and realization. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009; 25(5):233-6.
39. Duffy DL, Box NF, Chen W, Palmer JS, Montgomery GW, James MR, et al. Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum Mol Genet* 2004; 13(4):447-61.
40. Duggirala R, Williams JT, Williams-Blangero S, Blangero J. A variance component approach to dichotomous trait linkage analysis using a threshold model. *Genet Epidemiol* 1997; 14(6):987-92.
41. Dyer KA, Charlesworth B, Jaenike J. Chromosome-wide linkage disequilibrium as a consequence of meiotic drive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(5):1587-92.
42. Eide MJ, Weinstock MA. Association of UV index, latitude, and melanoma incidence in nonwhite populations--US Surveillance, Epidemiology, and

- End Results (SEER) Program, 1992 to 2001. *Arch Dermatol* 2005; 141(4):477-81.
43. Elosua R, Lluís C, Lucas G. Estudio del componente genético de la cardiopatía isquémica: de los estudios de ligamiento al genotipado integral del genoma. *Rev Esp Cardiol Supl* 2009; 9:24B-38B.
44. Enninga IC, Groenendijk RT, Filon AR, van Zeeland AA, Simons JW. The wavelength dependence of u.v.-induced pyrimidine dimer formation, cell killing and mutation induction in human diploid skin fibroblasts. *Carcinogenesis* 1986; 7(11):1829-36.
45. Entrez SNP. Disponible en: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>
46. European Cancer Observatory, 2010. Disponible en: URL: <http://eu-cancer.iarc.fr/cancer-11-melanoma-of-skin.html,en>
47. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. [IARC CancerBase No. 5. Version 2.0]. Lyon, IARC Press. IARC CancerBase; 2004. Disponible en: URL: <http://www-dep.iarc.fr/>
48. Fernández LP, Milne RL, Pita G, Avilés JA, Lázaro P, Benítez J, et al. SLC45A2: a novel malignant melanoma-associated gene. *Hum Mutat* 2008; 29(9):1161-7.
49. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988; 124(6):869-71.
50. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296(5576):2225-9.
51. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005; 41(1):28-44. (a)

52. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005; 41(14):2040-59. (b)
53. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009; 27(1):3-9.
54. García-Borrón JC, Sánchez-Laorden BL, Jiménez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 2005; 18(6):393-410.
55. García-Foncillas J, Bandrés E, Catalán V, García-Amigot F, Zabalegui N. Conceptos básicos en biología molecular del cáncer. Susceptibilidad genética. *Anales Sis San Navarra* 2001; 24 (Supl. 1): 31-52.
56. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; 436(7047):117-22.
57. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 2003; 21(3):217-28.
58. Goggins W, Gao W, Tsao H. Association between female breast cancer and cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 2004; 111(5):792-4
59. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, et al; Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 2006; 66(20):9818-2
60. Goldstein AM, Chaudru V, Ghiorzo P, Badenas C, Malveyh J, Pastorino L, et al. Cutaneous phenotype and MC1R variants as modifying factors for the development of melanoma in CDKN2A G101W mutation carriers from 4 countries. *Int J Cancer* 2007; 121(4):825-31.

61. Goodfellow PJ. Inherited cancers associated with the RET proto-oncogene. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4(3):446-52.
62. Graf J, Hodgson R, van Daal A. Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. *Hum Mutat* 2005; 25(3):278-84.
63. Gruber SB, Armstrong BK. Cutaneous and ocular melanoma. En: Schottenfeld D Fraumeni, FJ editors. *Cancer epidemiology and prevention*. 3^a ed. Nueva York: Oxford University Press; 2006. p. 1196-1229.
64. Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, et al. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2008; 40(7):886-91.
65. Guedj M, Bourillon A, Combadières C, Rodero M, Dieudé P, Descamps V, et al. Variants of the MATP/SLC45A2 gene are protective for melanoma in the French population. *Hum Mutat* 2008; 29(9):1154-60.
66. Guo SW, Lange K. Genetic mapping of complex traits: promises, problems, and prospects. *Theor Popul Biol* 2000; 57(1):1-11.
67. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med* 2002; 347(19):1512-20.
68. Haber, D.A., Fearon, E.R. The promise of cancer genetics. *Lancet* 1998; 351 Suppl 2:SII1-8.
69. Haig D. Games in tetrads: segregation, recombination, and meiotic drive. *Am Nat* 2010; 176(4):404-13.
70. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250(4988):1684-9.

71. Han J, Qureshi AA, Prescott J, Guo Q, Ye L, Hunter DJ, De Vivo I. A prospective study of telomere length and the risk of skin cancer. *J Invest Dermatol* 2009; 129(2):415-21.
72. Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 1969; 223(5204):363-8.
73. Healy E. Melanocortin 1 receptor variants, pigmentation, and skin cancer susceptibility. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20(6):283-8.
74. Hedrick, P.W. Quantitative traits and evolution. En: Hedrick PW, editor. *Genetics of populations*. 2nd ed. Sudbury: Jones and Barlett Publishers; 2000. p. 445-500.
75. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 4(2):45-61.
76. Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol* 2008; 128(11):2575-95.
77. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411(6835):366-74.
78. Huang W, He Y, Wang H, Wang Y, Liu Y, Wang Y, et al. Linkage disequilibrium sharing and haplotype-tagged SNP portability between populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(5):1418-21.
79. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8(1):15-21.
80. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; 449(7164):851-61.
81. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426(6968):789-96.

82. International Human Genome Mapping Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.
83. Ito S, Wakamatsu K. Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* 2008; 84(3):582-92.
84. Jackson IJ. Identifying the genes causing human diversity. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(9):979-80.
85. Jackson S, Harland M, Turner F, Taylor C, Chambers PA, Randerson-Moor J, et al. No Evidence for BRAF as a melanoma/nevus susceptibility gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(4):913-8.
86. Jakobsdottir J, Gorin MB, Conley YP, Ferrell RE, Weeks DE. Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers. *PLoS Genet* 2009; 5(2):e1000337.
87. Janssens AC, Gwinn M, Bradley LA, Oostra BA, van Duijn CM, Khoury MJ. A critical appraisal of the scientific basis of commercial genomic profiles used to assess health risks and personalize health interventions. *Am J Hum Genet* 2008; 82(3):593-9.
88. Jawaid S, Khan TH, Osborn HM, Williams NA. Tyrosinase activated melanoma prodrugs. *Anticancer Agents Med Chem* 2009 Sep;9(7):717-27.
89. Jones N, Ougham H, Thomas H, Pasakinskiene I. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytol* 2009; 183(4):935-66.
90. Kadekaro AL, Kanto H, Kavanagh R, Abdel-Malek ZA. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 994:359-65. (a)
91. Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res* 2003 Oct; 16(5):434-47. (b)
92. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002; 12(4):390-9.

93. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, Bouwes Bavinck JN. Chemical exposures other than arsenic are probably not important risk factors for squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma and malignant melanoma of the skin. *Br J Dermatol* 2005; 152(1):194-7.
94. Kobayashi T, Hearing VJ. Direct interaction of tyrosinase with Tyrp1 to form heterodimeric complexes in vivo. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 24):4261-8.
95. Krenzel S, Hauschild A, Schäfer T. Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *Br J Dermatol* 2006; 155(1):1-8.
96. Krüger S, Garbe C, Büttner P, Stadler R, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma. Results of a case control study in melanoma patients and nonmelanoma control subjects. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(6):920-6.
97. LaFuente, A. Polimorfismos genéticos: susceptibilidad para el desarrollo de cáncer y predicción de la respuesta al tratamiento. *GH Continuada* 2004; 3:20-4.
98. Lamason RL, Mohideen MA, Mest JR, Wong AC, Norton HL, Aros MC, et al. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 2005; 310(5755):1782-6.
99. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274(5287):536-9.
100. Landi MT, Kanetsky PA, Tsang S, Gold B, Munroe D, Rebbeck T, et al. MC1R, ASIP, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(13):998-1007.
101. Langseth H, Andersen A. Cancer incidence among male pulp and paper workers in Norway. *Scand J Work Environ Health* 2000; 26(2):99-105.
102. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 2003; 85(11):1101-11.

103. Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 2008; 624:89-103.
104. Li C, Chen K, Liu Z, Wang LE, Gershenwald JE, Lee JE, et al. Polymorphisms of TP53 Arg72Pro, but not p73 G4C14>A4TA4 and p21 Ser31Arg, contribute to risk of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128(6):1585-8.
105. Luo L, Peng G, Zhu Y, Dong H, Amos CI, Xiong M. Genome-wide gene and pathway analysis. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(9):1045-53.
106. Luque J, Herráez A. *Diversidad del genoma*. Madrid: Harcourt;2001.
107. Lynde CW, Sapra S. Predictive testing of the melanocortin 1 receptor for skin cancer and photoaging. *Skin Therapy Lett* 2010; 15(1):5-7.
108. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008; 118(5):1590-605.
109. Marcoval J, Moreno A, Torras A, Baumann E, Graells J, Gallego MI. Evolución del melanoma maligno cutáneo en los últimos 19 años en un hospital terciario de la cuenca mediterránea. *Actas Dermosifiliogr* 2008; 99(6):464-8.
110. Marín D, Del Pozo A. Pigmentación de la piel (I). Melaninas: conceptos generales e implicaciones cosméticas. *Offarm* 2005; 24:116-8.
111. McKee, P. *Pathology of the Skin*. 2nd ed. London: Mosby-Wolfe; 1996.
112. Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet* 2009; 126(4):499-510.
113. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355(1):51-65.
114. Miller CT, Beleza S, Pollen AA, Schluter D, Kittles RA, Shriver MD, et al. cis-Regulatory changes in Kit ligand expression and parallel evolution of pigmentation in sticklebacks and humans. *Cell* 2007; 131(6):1179-89.
115. Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 2006; 16(9):1182-90.

116. Mocellin S, Nitti D. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer* 2008; 113(9):2398-407.
117. Mocellin S, Verdi D, Nitti D. DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis* 2009; 30(10):1735-43.
118. Morton NE. Secuential test for the detection of linkage. *Hum Genet* 1995; 7:277-318.
119. Mössner R, Anders N, König IR, Krüger U, Schmidt D, Berking C, et al. Variations of the melanocortin-1 receptor and the glutathione-S transferase T1 and M1 genes in cutaneous malignant melanoma. *Arch Dermatol Res.* 2007; 298(8):371-9.
120. Murphy, G. Histology of the skin. En: Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B, eds. *Lever's Histopathology of the Skin*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
121. Nagore E, Botella-Estrada R, Requena C, Serra-Guillén C, Martorell A, Hueso L, et al. Perfil clínico y epidemiológico de los pacientes con melanoma cutáneo según el grado de exposición solar de la localización del melanoma. *Actas Dermosifiliogr* 2009; 100(3):205-11.
122. Nakai N, Kishida T, Hartmann G, Katoh N, Imanishi J, Kishimoto S, et al. Mitf silencing cooperates with IL-12 gene transfer to inhibit melanoma in mice. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(4):540-5.
123. Nan H, Kraft P, Hunter DJ, Han J. Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. *Int J Cancer* 2009; 125(4):909-17
124. Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol* 2009; 27(1):46-52.

125. Newton Bishop JA, Bataille V, Pinney E, Bishop DT. Family studies in melanoma: identification of the atypical mole syndrome (AMS) phenotype. *Melanoma Res* 1994; 4(4):199-206.
126. Nordlund JJ. The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded concept. *Dermatol Clin* 2007; 25(3):271-81, vii.
127. Norton HL, Kittles RA, Parra E, McKeigue P, Mao X, Cheng K, et al. Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians. *Mol Biol Evol* 2007; 24(3):710-22.
128. Norval M, Cullen AP, de Gruijl FR, Longstreth J, Takizawa Y, Lucas RM, et al. The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6(3):232-51.
129. Parkin DW, Whelan SL, Ferlay J. *Cancer Incidence in Five Continents, Volume VII*. IARC Scientific Publications N. 143. Lyon: IARC; 1997.
130. Parra EJ. Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health. *Am J Phys Anthropol* 2007; Suppl 45:85-105.
131. Pérez Oliva AB, Fernández LP, Detorre C, Herráiz C, Martínez-Escribano JA, Benítez J, et al. Identification and functional analysis of novel variants of the human melanocortin 1 receptor found in melanoma patients. *Hum Mutat* 2009; 30(5):811-22.
132. Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 2005; 571(1-2):19-31.
133. Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opin Oncol* 2006; 18(2):173-9.
134. Pho LN, Leachman SA. Genetics of pigmentation and melanoma predisposition. *G Ital Dermatol Venereol* 2010; 145(1):37-45.

135. Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:705-22.
136. Pjanova D, Molven A, Akslen LA, Engele L, Streinerte B, Azarjana K, et al. Identification of a CDK4 R24H mutation-positive melanoma family by analysis of early-onset melanoma patients in Latvia. *Melanoma Res* 2009; 19(2):119-22.
137. Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol* 2005; 23(13):3043-51.
138. Puri N, Gardner JM, Brilliant MH. Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (p) mutant melanocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115(4):607-13.
139. Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, et al. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 2009; 41(2):221-7.
140. Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, Chang YM, Beswick S, Kukulizch K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data. *Eur J Cancer* 2009; 45(18):3271-81.
141. Ranum LP, Day JW. Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends Genet.* 2004; 20(10):506-12.
142. Rass K, Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 624:162-78.
143. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444(7118):444-54.
144. Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* 2003;37:67-90.

145. Rizos H, Puig S, Badenas C, Malveyh J, Darmanian AP, Jiménez L, et al. A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene* 2001; 20(39):5543-7.
146. Ródenas JM, Delgado-Rodríguez M, Herranz MT, Tercedor J, Serrano S. Sun exposure, pigmentary traits, and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* 1996; 7(2):275-83.
147. Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J, Rodríguez-Gallego JC. Variabilidad genética en la susceptibilidad y en la gravedad de la neumonía. *Arch Bronconeumol* 2005; 41(Supl 5):21-9.
148. Rulyak SJ, Brentnall TA, Lynch HT, Austin MA. Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer* 2003; 98(4):798-804.
149. Rüniger TM, Kappes UP. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008; 24(1):2-10.
150. Rüniger TM. C-->T transition mutations are not solely UVB-signature mutations, because they are also generated by UVA. *J Invest Dermatol* 2008; 128(9):2138-40.
151. Sáenz S, Conejo-Mir J, Cayuela A. Epidemiología del melanoma en España. *Actas Dermosifiliogr* 2005; 96(7):411-8.
152. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res* 2003; 526(1-2):53-61.
153. Sarkar-Agrawal P, Vergilis I, Sharpless NE, DePinho RA, Rüniger TM. Impaired processing of DNA photoproducts and ultraviolet hypermutability with loss of p16INK4a or p19ARF. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(23):1790-3.
154. Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine

- and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 2002; 15(6):433-9.
155. Sekulic A, Haluska P Jr, Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, et al; Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(7):825-46.
156. Settimi L, Comba P, Carrieri P, Boffetta P, Magnani C, Terracini B, et al. Cancer risk among female agricultural workers: a multi-center case-control study. *Am J Ind Med* 1999; 36(1):135-41.
157. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* 2009; 578:3-22.
158. Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22(5):563-79.
159. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004 Oct;84(4):1155-228.
160. Stacey SN, Sulem P, Masson G, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, et al. New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2009; 41(8):909-14.
161. Stierner U, Augustsson A, Rosdahl I, Suurküla M. Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma site and sun exposure. A case-control study. *Melanoma Res* 1992; 1(5-6):367-75.
162. Stoitznier P, Pfaller K, Stössel H, Romani N. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118(1):117-25.
163. Stratigos AJ, Katsambas AD. The value of screening in melanoma. *Clin Dermatol* 2009; 27(1):10-25.

164. Sturm RA, Teasdale RD, Box NF. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 2001; 277(1-2):49-62.
165. Sturm RA. A golden age of human pigmentation genetics. *Trends Genet* 2006; 22(9):464-8.
166. Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet* 2009; 18(R1):R9-17.
167. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Jakobsdottir M, et al. Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 2008; 40(7):835-7.
168. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 2007; 39(12):1443-52.
169. Szigeti K, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(6):703-10.
170. Tadokoro T, Yamaguchi Y, Batzer J, Coelho SG, Zmudzka BZ, Miller SA, et al. Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 2005; 124(6):1326-32.
171. Terwilliger JD, Göring HH. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol* 2000; 72(1):63-132.
172. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet* 2009; 374(9687):362-5.
173. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 2007; 39(8):984-8.
174. Udayakumar D, Tsao H. Melanoma genetics: an update on risk-associated genes. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23(3):415-29.

175. Vink JM, Boomsma DI. Gene finding strategies. *Biol Psychol* 2002; 61(1-2):53-71.
176. von Thaler AK, Kamenisch Y, Berneburg M. The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Exp Dermatol* 2010; 19(2):81-8.
177. Voris JP, Sitailo LA, Rahn HR, Defnet A, Gerds AT, Sprague R, et al. Functional alterations in protein kinase C beta II expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23(2):216-24.
178. Wachsmuth RC, Gaut RM, Barrett JH, Saunders CL, Randerson-Moor JA, Eldridge A, et al. Heritability and gene-environment interactions for melanocytic nevus density examined in a U.K. adolescent twin study. *J Invest Dermatol* 2001; 117(2):348-52.
179. Walker GJ, Hayward NK. Pathways to melanoma development: lessons from the mouse. *J Invest Dermatol* 2002; 119(4):783-92.
180. Wang L, Jameson SC, Hogquist KA. Epidermal Langerhans cells are not required for UV-induced immunosuppression. *J Immunol* 2009; 183(9):5548-53.
181. Weinstock MA. Controversies in the role of sunlight in the pathogenesis of cutaneous melanoma. *Photochem Photobiol.* 1996; 63(4):406-10.
182. Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One* 2008; 3(7):e2734.
183. Whiteman DC, Brown RM, Purdie DM, Hughes MC. Melanocytic nevi in very young children: the role of phenotype, sun exposure, and sun protection. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(1):40-7.
184. Wikonkal NM, Brash DE. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; 4(1):6-10.
185. Wolber R, Schlenz K, Wakamatsu K, Smuda C, Nakanishi Y, Hearing VJ, et al. Pigmentation effects of solar-simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21(4):487-91.

186. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. Fitzpatrick Dermatología en Medicina General. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.
187. Wolnicka-Glubisz A, Noonan FP. Neonatal susceptibility to UV induced cutaneous malignant melanoma in a mouse model. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5(2):254-60.
188. Xie T, Nguyen T, Hupe M, Wei ML. Multidrug resistance decreases with mutations of melanosomal regulatory genes. *Cancer Res* 2009; 69(3):992-9.
189. Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(4):1148-54
190. Yang H, Zhong Y, Peng C, Chen JQ, Tian D. Important role of indels in somatic mutations of human cancer genes. *BMC Med Genet* 2010; 11:128.
191. Zerp SF, van Elsas A, Peltenburg LT, Schrier PI. p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br J Cancer* 1999; 79(5-6):921-6