

Iniciación a la experimentación en el ámbito de la Biología Celular, Molecular, Genética y Evolutiva

Solución actividad 6



Ana Isabel Aguirre Escobal

Santos Alonso Alegre

Ainhoa Iglesias Ara

Neskuts Izagirre Arribalzaga

Isabel Smith Zubiaga

Beñat Zaldibar Aranburu

Facultad de Ciencia y Tecnología

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

OCW
OpenCourseWare



El fenotipo pigmentario como ejemplo de una investigación multidisciplinar

Iglesias Ara A, Alonso Alegre S, Izagirre Arribalzaga N, Smith Zubiaga I, Zaldibar Aranburu B and Aguirre Escobal AI

RESUMEN

En humanos, el fenotipo pigmentario se ha asociado a factores evolutivos relacionados con la protección a la radiación ultravioleta y, por tanto, con el riesgo de padecer melanoma cutáneo. Este fenotipo es, en última instancia, el resultado de la cantidad de eumelanina producida por los melanocitos mediante un proceso metabólico complejo que se inicia a partir de un inductor externo (la radiación ultravioleta) y de la consecuente activación de una proteína transmembrana denominada Receptor 1 de la melanocortina (MC1R). En las poblaciones humanas actuales se han descrito algunas mutaciones en el gen *MC1R* cuyas frecuencias varían entre poblaciones. Algunas de las ellas, por ejemplo la denominada R151C, se han asociado a una menor producción de eumelanina y a un mayor riesgo de melanoma. Esta relación podría ser consecuencia de la menor protección a la radiación de las células portadoras de la mutación, por su menor capacidad de síntesis de melanina, o por la alteración en la inhibición de la proliferación celular que, en condiciones normales, acompaña a la melanogénesis.

En este trabajo demostramos que la mutación R151C impide que la proteína MC1R alcance la membrana celular en los melanocitos y, en consecuencia, que se active la melanogénesis y se sintetice eumelanina. También demostramos que la mutación impide que las células respondan al estímulo antiproliferativo que sucede, en cambio, con la versión ancestral del gen MC1R. El análisis de la distribución geográfica de esta mutación y de otras similares en el gen MC1R son concordantes con la interpretación de que en poblaciones sometidas a una elevada intensidad de radiación solar, la selección purificadora evita la presencia de alelos no funcionales para la melanogénesis, mientras que en zonas de menor intensidad lumínica, estas versiones no funcionales para la síntesis de eumelanina son permitidas, probablemente debido a que en ese ambiente resultan beneficiosas para la síntesis de Vitamina D y para evitar la fotodegradación de otras moléculas necesarias para la supervivencia.

INTRODUCCIÓN

La melanina es una molécula pigmentaria relacionada con la coloración de la piel, del pelo y de los ojos. La melanina dérmica es producida por los melanocitos, un tipo de células que se encuentran en la epidermis y en el folículo piloso, cuya principal función es la de producir melanina. Los melanocitos producen 2 formas de melanina: la eumelanina (de color negro o marrón) y la feomelanina (de color amarillo o rojo). El color del pigmento de un tejido depende de la cantidad relativa de estos dos pigmentos producidos por sus melanocitos. La eumelanina protege la piel del daño causado por las radiaciones ultravioleta, mientras que la feomelanina no. Por ello, las personas que sintetizan más proporción de feomelanina tienen mayor riesgo de sufrir daño en la piel por radiación solar que las personas que producen mayor proporción de eumelanina (García-Borrón *et al.*, 2014).

A pesar de que los seres humanos poseemos concentraciones similares de melanocitos en las mismas zonas de la piel, se producen variaciones fenotípicas entre individuos y entre grupos étnicos que dependen de cuestiones genéticas pero también de factores ambientales relacionados con la activación de la ruta de síntesis de melanina (García-Borrón *et al.*, 2014; Robins, 1991).

El fenotipo pigmentario o fototipo se ha asociado a factores evolutivos relacionados con la protección a la radiación ultravioleta y, por tanto, con el riesgo de padecer melanoma cutáneo. En europeos, el fototipo se ha interpretado como la consecuencia de combinar esa función protectora con la necesidad de sintetizar vitamina D, la cual se produce en la piel tras su irradiación con luz UV. De acuerdo con esta idea, en latitudes con escasa radiación solar, la piel oscura dificultaría la síntesis de vitamina D, lo que a su vez ocasionaría una mala formación del esqueleto, resistencia a la insulina, alta presión sanguínea y defectos en la función inmune (Robins, 1991).

La producción de melanina es el paso final de una compleja ruta de señalización intracelular en la que intervienen diversas proteínas sintetizadas por una red de genes. El principal es el gen que codifica la proteína MC1R. MC1R es una proteína con 7 dominios de transmembrana que se encuentra en la membrana de los melanocitos. Cuando el receptor es activado, se inicia una cascada de reacciones químicas en el interior del melanocito que se concretan en la estimulación de la producción de eumelanina en esa célula; si el receptor no está activado o está bloqueado, los melanocitos elaboran feomelanina en lugar de eumelanina. La activación de MC1R puede inducirse mediante la hormona estimulante de melanocitos (melanotropina, α -MSH), la cual a su vez puede ser inducida por la luz ultravioleta (García-Borrón *et al.*, 2014). La estimulación de MC1R por la hormona α -MSH resulta en la activación de proteína G, la cual, mediante el enzima Adenil ciclasa (AC), induce un incremento en los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, estimulando, a su vez, el factor de transcripción microftalmia (MITF), cuya expresión conduce a la activación de los genes de tirosinasa (*TYR*) y de otros relacionados (como *TYRP1*, *DCT*) y, finalmente, a la síntesis de eumelanina (Sánchez Más *et al.*, 2002; García-Borrón *et al.*, 2014).

En condiciones normales, la inducción de melanogénesis viene acompañada de un bloqueo de la proliferación celular. Así, se ha observado que la activación de MC1R inhibe la proliferación celular de los melanocitos (Smalley & Eisen, 2000).

En humanos se han detectado más de 100 variaciones genéticas comunes (polimorfismos) en el gen *MC1R*. Varios de estos polimorfismos están asociados al fototipo pigmentario y son, por ejemplo, más frecuentes en personas pelirrojas, con piel clara, pecas, y mayor sensibilidad a la exposición solar. Ejemplos típicos de variantes alélicas asociadas al fenotipo “pelirrojo” son, por ejemplo, las mutaciones R151C, R160W y D294H, las cuales aparecen en el 60% de las personas pelirrojas que hay en el mundo. De entre ellas, destaca por su frecuencia y relevancia la mutación R151C, la cual además ha sido asociada a un mayor riesgo de melanoma (Duffy *et al.*, 2010).

Actualmente, queda por esclarecer el mecanismo molecular por el que estas mutaciones, y en especial, la mutación R151C, aumentan el riesgo de melanoma. Es posible que modificaciones que alteran la conformación de la proteína MC1R, y especialmente aquellas que afectan a los residuos de aminoácidos que están evolutivamente muy conservados, como el 151, afecten a la función melanogénica. Si esto fuese así, el riesgo de melanoma estaría relacionado con la alteración de la protección pigmento-dependiente, de forma que una menor producción de melanina resultaría en una menor fotoprotección y esto, a su vez, ocasionaría inestabilidad genómica. Por otro lado, también es posible que las mutaciones en el gen *MC1R* bloqueen mecanismos de protección pigmento-independientes, que en condiciones normales se activan tras la estimulación de la proteína MC1R (Smalley & Eisen, 2000). De ser así, melanocitos portando estas mutaciones podrían ser refractarios al estímulo antiproliferativo que supone la activación de MC1R.

El objetivo de este trabajo es demostrar que la mutación R151C en la proteína MC1R provoca cambios a nivel celular que afectan a la capacidad de los melanocitos de sintetizar eumelanina y de bloquear la proliferación, y que la distribución de esta mutación en las poblaciones humanas actuales podría tener implicaciones evolutivas y médicas relevantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y tratamiento

Las células de melanoma murino B16-F10 se mantuvieron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% y penicilina/estreptomicina a 37°C y en una atmósfera con CO₂ al 5%. Para el tratamiento con luz ultravioleta, los cultivos fueron expuestos a una dosis de 75mJ/cm². Para ello se introdujeron en una cámara de irradiación equipada con una lámpara que emite longitudes de onda entre 270 y 390 nm, estando el 60% de la radiación dentro del espectro de emisión de la radiación UVB (280-320 nm).

Expresión de hMC1R ancestral y mutado

Los plásmidos de expresión portando la secuencia ancestral de MC1R humano (pCDNA3-wt hMC1R) o la secuencia mutada de MC1R (pCDNA3-R151C-hMC1R) fueron amablemente cedidos por José Carlos García-Borrón. Se emplearon 2 ug de pCDNA3-wt hMC1R, pCDNA3-R151C-hMC1R o vector vacío para transfectar células al 60-80% de confluencia, empleando el reactivo de transfección *jetPRIME*.

Inmunohistoquímica

Las células B16-F10 se cultivaron en placas sobre cubres de cristal. Cuando alcanzaron la confluencia adecuada, se transfectaron con los vectores de expresión y 24 horas después se fijaron en paraformaldehído al 10%, se permeabilizaron con 0,2% Triton X-100 y se incubaron empleando 5 mg/ml de anticuerpo primario que reconoce la proteína MC1R humana seguido del anticuerpo secundario que reconoce IgG humana acoplado a Alexa Fluor 594. El DNA se tiñó empleando Hoechst 33288 y el análisis de imagen se realizó empleando el microscopio Olympus Fluoview FV500 y el software Olympus Flouview 1.7b.

Análisis de expresión génica mediante RT-PCR

Las células B16-F10 se cultivaron en placas y cuando alcanzaron la confluencia adecuada se transfectaron con vectores de expresión pCDNA3-wt hMC1R, pCDNA3-R151C-hMC1R o vector vacío. 24 horas después se sometieron al tratamiento con UVB y tras 24h se extrajo el RNA total empleando el reactivo *TRizol*. Se emplearon 2 ug de RNA total para sintetizar cDNA mediante el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit*. La PCR se realizó empleando puReTaq Ready-To-Go PCR Beads y 0,5 uM de cebadores para los genes *hMC1R*, *mTyr* y *mGapdh* (Tabla 1).

Gen	F (Directo)	R (Reverso)
<i>hMC1R</i>	GCAGCAGCTGGACAATGTCA	GCCCCAGCAGAGGAAGAAAA
<i>mTyr</i>	CTTGGGGGCTCTGAAATATG	TAGTGGTCCCTCAGGTGTTC
<i>mGapdh</i>	AAGGGCTCATGACCACAGTC	CACATTGGGGGTAGGAACAC

Tabla 1: Secuencia de cebadores empleados para RT-PCR.

Los productos de la PCR se migraron en electroforesis con bromuro de etidio en gel de agarosa al 2%, a 10-15 volt/cm. La imagen fue capturada con un sistema de detección con UV Chemi-

doc. La cantidad relativa de los cDNAs fue normalizada empleando *mGapdh* como control interno.

Cuantificación de melanina

Las células B16-F10 se cultivaron en placas y cuando alcanzaron la confluencia adecuada se transfectaron con los vectores de expresión pCDNA3-wt hMC1R, pCDNA3-R151C-hMC1R o vector vacío. 24 horas después se sometieron al tratamiento con UVB y tras 24h las células se recolectaron empleando una solución enzimática con tripsina. Se incubaron en 1N NaOH a 60°C durante una hora y se registró la absorbancia a 405 nm empleando un lector de placas.

Análisis de proliferación y viabilidad celular

Las células B16-F10 se cultivaron en placas y cuando alcanzaron la confluencia adecuada se transfectaron con los vectores de expresión pCDNA3-wt hMC1R, pCDNA3-R151C-hMC1R o vector vacío. Para analizar la proliferación y la viabilidad celular se trataron con una solución enzimática con tripsina, se tiñeron con el colorante de exclusión vital azul Trypan y se contaron empleando una cámara Neubauer.

Análisis poblacional

La secuencia de referencia del gen *MC1R* humano se obtuvo mediante el Genome Browser de la base de datos de la Universidad de California, Santa Cruz. También se obtuvieron los haplotipos del gen disponibles en la base de datos del Proyecto 1000 Genomas de las poblaciones africanas y europeas. Se empleó el software DnaSP (<http://www.ub.edu/dnasp/>) para realizar el test D de Tajima (Tajima, 1989) y estimar el efecto de la selección en la distribución de las frecuencias haplotípicas.

RESULTADOS

Los análisis inmunohistoquímicos de las células B16-F10 transfectadas con la versión ancestral del gen *hMC1R* y con la versión mutada *hMC1R-R151C*, mostraron diferencias en cuanto a la localización de la proteína en las células (Figura 1). Así, mientras que la proteína *hMC1R* ancestral se localizó en la membrana plasmática, la versión portadora de la mutación R151C se observó distribuída de forma difusa por todo el citoplasma, mostrando incapacidad para acceder a la membrana plasmática.

La presencia de la proteína MC1R en la membrana celular resulta esencial para que su ligando pueda activar la proteína y, en consecuencia, para desencadenar la inducción de la expresión de genes melanogénicos. Para comprobar si la versión mutada del gen *hMC1R-R151C* afecta a la activación de la ruta, hemos analizado los niveles de expresión transcripcional de uno de los genes que forma parte de esta ruta (el gen *mTyr*) en células de ratón B16-F10 transfectadas con las versiones salvaje y mutada del gen *hMC1R* y estimuladas con luz UVB. Los resultados de este análisis, mostrados en la Figura 2, indican que, si bien la expresión del *hMC1R* exógeno es elevada y similar en células transfectadas con la versión ancestral y con la versión mutada, la expresión de *mTyr* es significativamente diferente en ambos casos. Así, como puede observarse en la Figura 2, el gen *mTyr* aumenta su expresión del orden de 10 veces cuando las células de ratón son transfectadas con la secuencia humana ancestral, mientras que su expresión es muy similar a la de las células trasfectadas con el vector vacío cuando las células de ratón se trasfectan con la versión mutada del gen *hMC1R*.

Dado que el resultado final de la activación de la vía regulada por MC1R es la acumulación de melanina, en este trabajo hemos analizado si las células B16-F10 transfectadas con las versiones ancestral y mutada del gen *hMC1R* y estimuladas con luz UVB producen cantidades significativamente diferentes de este pigmento. De acuerdo con los resultados que se indican en la Figura 3, las células transfectadas con la versión ancestral del gen *hMC1R* producen una cantidad significativamente superior de melanina, respecto a las células trasfectadas con el control, mientras que este incremento no sucede cuando las células se transfectan con la versión mutada.

Estudio previos han indicado que la activación de MC1R, además de activar la síntesis de melanina, inhibe la proliferación celular (Smalley & Eisen, 2000). Para testar si la mutación R151C tiene algún efecto sobre la proliferación celular, hemos analizado el crecimiento de cultivos transfectados con la versión ancestral y con la versión mutada del gen *hMC1R*. Los resultados de este análisis (Figura 4) indican que las células que portan la versión ancestral dejan de proliferar tras su estimulación con UVB, mientras que las células que expresan la versión mutada no responden a este estímulo antiproliferativo.

De acuerdo con estos resultados, la presencia del alelo R151C tendría efectos negativos tanto en la síntesis de melanina como en el bloqueo de la proliferación inducidos por UVB.

En cuanto al análisis de la distribución de esta mutación R151C en las poblaciones humanas actuales, el análisis de los datos disponibles correspondientes a las poblaciones que forman parte del proyecto 1000Genomas (fase 1) indica que esta mutación es prácticamente inexistente en poblaciones africanas, mientras que presenta una frecuencia relativamente elevada en poblaciones europeas (Tabla 2). Además, se puede observar que la frecuencia de la mutación varía dentro de las poblaciones europeas; así, en las poblaciones del Sur de Europa (IBS, TSI) la frecuencia del alelo R151C es cercana a 0.02, mientras que en el Norte de Europa (GBR, FIN, CEU) ronda el 0.1 (Tabla 2). Estos resultados sugieren que esta mutación está bajo selección negativa en la población africana mientras que dicha selección parece haberse relajado en las poblaciones europeas, donde, además, la frecuencia de la mutación aumenta con la latitud.

El análisis de la diversidad haplotípica de todo el locus *MC1R* y del efecto de la selección en las diferentes poblaciones realizado mediante el test D de Tajima, indica que la diversidad haplotípica es elevada en poblaciones africanas, pero aun lo es más en poblaciones del norte de Europa (Tabla 3). En las poblaciones europeas el test D de Tajima no es significativo, indicando que en estas poblaciones las variantes alélicas del gen *MC1R* no están sometidas a selección. Sin embargo, en la población africana el valor de la prueba es negativo y significativo, indicando que en esta población este gen está sometido a selección purificadora, la cual eliminaría las nuevas variantes alélicas que podrían surgir.

DISCUSIÓN

El fenotipo pigmentario es un ejemplo de la compleja relación que, en ocasiones, se establece entre el genotipo y el ambiente: el grado de pigmentación es el resultado, entre otros factores, de la actuación de la radiación solar y de la respuesta fisiológica que se produce en el interior de los melanocitos, mediante la regulación de la expresión de una compleja red de genes y de reacciones metabólicas, que finaliza con la síntesis de melanina. Este carácter es, además, especialmente interesante desde el punto de vista biológico por sus importantes connotaciones evolutivas, ya que este fenotipo está sometido a la acción de la selección natural, tanto por la capacidad fotoprotectora de la melanina frente a las radiaciones ultravioleta y, por tanto, por su papel protector frente al riesgo de melanoma, como por su capacidad de evitar la fotodegradación de ciertas vitaminas como riboflavinas, carotenoides, tocoferoles, y ácido fólico (Gambichler *et al.*, 2001).

De acuerdo con las propuestas actualmente aceptadas en cuanto al origen de las poblaciones humanas actuales, el continente africano sería el punto de origen de un número aún no completamente determinado de salidas de grupos de poblaciones, que habrían ido extendiéndose por diferentes zonas del planeta en radiaciones sucesivas (Tishkoff, 2009). Supuestamente, esas poblaciones originales tendrían la piel oscura, al igual que los actuales indígenas africanos. La disminución de la presión selectiva en las poblaciones que emigraron y se establecieron en zonas de Asia y Europa, donde la radiación solar es menos intensa, habría permitido la progresiva aparición y extensión de fenotipos menos pigmentados.

En este trabajo, nosotros mostramos que el equilibrio entre ventajas y desventajas de tener gran cantidad de melanina, dependiendo de la población a la que se pertenezca y de sus condiciones climáticas en cuanto a la intensidad de radiación solar, puede ser explicada, al menos parcialmente, por la presencia de variantes genéticas en algunos genes que participan en la síntesis de melanina, como por ejemplo, la mutación R151C del gen *MC1R*.

De acuerdo con nuestros análisis, la presencia en el gen *MC1R* de la mutación R151C y de otros polimorfismos que impiden la correcta función de esta proteína, están sometidos a la actuación de la selección purificadora en el continente africano. De no existir esta selección, se esperaría que la diversidad genética en África fuese la más elevada de entre las poblaciones analizadas, debido a su mayor tamaño poblacional inicial y a su mayor tiempo de evolución (Durbin, 2012). Sin embargo, esto no es lo que se observa de los análisis haplotípicos, sugiriendo que la selección purificadora elimina de las poblaciones africanas las variantes alélicas que surgen *de novo* en el gen *MC1R*, pero que resultarían evolutivamente perjudiciales. Así, mutaciones que impidan que el gen *MC1R* active la ruta de síntesis de melanina, serían rápidamente eliminadas de las poblaciones con mayor radiación solar (las del ecuador), debido a la pérdida del efecto protector de la eumelanina sobre el daño causado por la radiación ultravioleta en la piel.

Sin embargo, de acuerdo con nuestros análisis sobre diversidad en poblaciones europeas, en regiones geográficas en las que los niveles de radiación solar son menores (como en el continente europeo), las mutaciones en el gen *MC1R* que afectan negativamente a la

síntesis de vitamina D, y en concreto la mutación R151C, no se encuentran bajo presión selectiva. Así, mutaciones en el gen *MC1R* habrían favorecido la aparición y extensión de un fenotipo más claro en los actuales europeos, como consecuencia de la necesidad de sintetizar vitamina D en un ambiente climático en que la intensidad de la radiación solar es inferior (Tishkoff et al., 2009). La vitamina D se sintetiza en la piel tras su irradiación con luz UV, por lo que en latitudes con escasa radiación solar, una piel oscura dificultaría la síntesis de melanina y esto podría tener efectos negativos sobre la salud, como una mala formación del esqueleto, resistencia a la insulina, alta presión sanguínea y defectos en la función inmune (Robins, 1991). No debemos olvidar que, además, la despigmentación tiene a su vez efectos nocivos relacionados con el aumento del riesgo de padecer melanoma cutáneo, un tipo de cáncer de piel que surge a consecuencia de una radiación solar excesiva que origina una transformación maligna de los melanocitos (Robins, 1991).

En este artículo, nosotros aportamos evidencias sobre el mecanismo que puede explicar la relación entre la mutación R151C, el fenotipo pigmentario y el melanoma. Así, de acuerdo con nuestros resultados, la mutación R151C impide la ubicación adecuada de la proteína MC1R en la membrana plasmática de los melanocitos, de forma que la presencia de este alelo mutado, evita que la proteína MC1R se transloque desde el retículo, a través del Golgi, hasta la membrana plasmática. El hecho de que la proteína MC1R no llegue a la membrana, que es la zona celular en la que debería localizarse para poder realizar su función como activador de la ruta de síntesis de melanina, es congruente con la menor expresión del gen *Tyr* que se observa en las células que son transfectadas con la versión mutante R151C y estimuladas con UVB. El gen *Tyr* codifica un enzima que es limitante para la síntesis de eumelanina, así que su nivel de expresión puede emplearse como sensor del estado de activación de la vía regulada por MC1R. De acuerdo con nuestros resultados, el gen *Tyr* aumenta su expresión 10 veces en las células transfectadas con la versión ancestral del gen MC1R, mientras que su expresión queda en niveles del control cuando las células son transfectadas con la versión mutada, indicando que la vía de síntesis de melanina no se activa con la versión mutada del gen *MC1R*.

La acumulación de melanina es el indicador último del estado de activación de la vía regulada por MC1R; la cuantificación de melanina realizada en este trabajo es congruente con los resultados anteriores, ya que se detecta una menor acumulación de melanina en las células transfectadas con la versión mutada del gen *MC1R* que en las que portan la versión ancestral.

Como ya se ha comentado, existe una relación entre portar la mutación R151C en el gen *MC1R* y presentar un incremento del riesgo de padecer melanoma (Duffy et al., 2010). De acuerdo con nuestros resultados, las células que portan la versión ancestral del gen *MC1R* dejan de proliferar tras su estimulación con UVB, mientras que las que expresan la versión mutada R151C, no responden al estímulo antiproliferativo. Por tanto, los resultados mostrados en este trabajo sugieren que, al menos, existen dos mecanismos por los que la mutación R151C aumentaría la probabilidad de padecer melanoma. Por un lado, la mutación R151C disminuye la protección pigmento-dependiente, ya que las células que

portan la mutación R151C son incapaces de activar la ruta de síntesis de melanina en respuesta a la luz UVB. Por otro lado, estas células son refractarias al estímulo antiproliferativo dependiente de la activación de MC1R, indicando que la mutación R151C elimina, además, la protección frente al melanoma mediante otra vía pigmento-independiente relacionada con el control de la proliferación celular.

En nuestra opinión, estos resultados moleculares aportan información relevante para comprender el mecanismo adaptativo al ambiente que es característico de este fenotipo. Así, la presencia de la mutación R151C y de otras que afectan a la funcionalidad de MC1R, incrementaría el riesgo de melanoma, pero en zonas geográficas de baja intensidad lumínica no estarían bajo selección purificadora debido a que en ese ambiente resultarían beneficiosas para la síntesis de Vitamina D y para evitar la fotodegradación de otras moléculas necesarias. Sin embargo, en poblaciones africanas sometidas a una intensidad lumínica superior, cualquier mutación en el gen *MC1R* que impida activar la ruta de síntesis de melanina, será eliminada. De acuerdo con estos datos, sería esperable que un individuo del norte de Europa que porte el alelo R151C presentase un mayor riesgo de melanoma si reside en regiones con elevada radiación solar; esto sería congruente con la elevada incidencia de melanoma que existe en la población caucásica australiana (de origen norte-europeo), en comparación con la de los aborígenes australianos (de pigmentación más oscura) (Rahman *et al.*, 2007). Por el contrario, sería esperable que un individuo con tez oscura que se expusiera a niveles de radiación propios de latitudes altas, presentase déficit de Vitamina D; esta propuesta es congruente con la mayor prevalencia de insuficiencia de Vitamina D descrita en población afroamericana (Harris, 2016).

En conclusión, queda evidente la compleja relación que se establece entre el genotipo y el ambiente en el caso del establecimiento del fenotipo pigmentario y cómo a través del mecanismo molecular y celular de actuación de una de las proteínas implicadas en la síntesis de melanina (MC1R), se puede explicar, al menos parcialmente, la adaptación de las poblaciones a su fenotipo pigmentario, como resultado de la integración del efecto protector de la melanina frente a una intensa radiación solar, la necesidad de la activación lumínica para la producción moléculas esenciales y la implicación de la ruta melanogénica en el control de la proliferación celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Duffy DL, Zhao ZZ, Sturm RA, Hayward NK, Martin NG, Montgomery GW. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(2):520-8.
2. Durbin R. A map of human genome variation population-scale sequencing. *Nature,* 2012; 467: 1061-1073.
3. García-Borrón JC, Abdel-Malek Z, Jiménez-Cervantes C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27(5):699-720.
4. Gambichler, Thilo et al. "Serum Folate Levels after UVA Exposure: A Two-Group Parallel Randomised Controlled Trial." *BMC Dermatology.* 2001; 8. *PMC.* Web. 13
5. Harris, SS. Vitamin D and African Americans. *J Nutr.* 2006; 136 (4): 1126-1129.
6. Rahman AM, Selva D, Davis G. Choroidal melanoma with extrascleral extension in an Australian Aboriginal man. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007 ;35(2):187-9.
7. Robins AH. (1991). *Biological perspectives in human pigmentation.* Cambridge University Press. ISBN-9780521365147.
8. Sánchez Más J, Olivares Sánchez C, Ghanem G, Haycock J, Lozano Teruel JA, García-Borrón JC, Jiménez-Cervantes C. Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur J Biochem.* 2002; 269(24):6133-41.
9. Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett.* 2000; 476(3):198-202.
10. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989; 123:585-595.
11. Tishkoff, Sarah A. et al. "The Genetic Structure and History of Africans and African Americans." *Science* 2009; 324 (5930): 1035–1044.

RECONOCIMIENTOS/AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su apoyo para la realización de esta investigación a la Comisión de Estudios del Grado de Biología de la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). También agradecen a la propia UPV/EHU la aportación económica realizada mediante asignación docente, la cual ha permitido obtener los resultados aquí mostrados. Agradecemos, asimismo, el apoyo de los técnicos docentes José R. García y Sara López, así como de los estudiantes que en el curso 2012-13 llevaron a la práctica el “Módulo I del Trabajo de Fin de Grado de investigación orientada en la especialidad Biología Celular, Molecular y Genética”.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses

LEYENDAS DE FIGURAS

Fig. 1: Microfotografías de la inmunohistoquímica de MC1R humana (fila superior) y tinción Hoechst para DNA (fila inferior) en células B16-F10 transfectadas con los vectores pCDNA vacío (Con), pCDNA-hMC1R (WT) o pCDNA-R151-MC1R (R151C). Los triángulos blancos representan la presencia de MC1R en la membrana plasmática. Barra de escala = 25 μ m.

Fig. 2: La figura **A** muestra los resultados de un experimento representativo de RT-PCR a partir de RNA obtenido de células B16-F10 transfectadas con los vectores pCDNA vacío (Con), pCDNA-hMC1R (WT) o pCDNA-R151-MC1R (R151C) y posteriormente expuestas a radiación UVB, empleando Gapdh como control endógeno. La figura **B** muestra la cuantificación de los resultados de RT-PCR. Se presentan las medias de los valores de expresión normalizados con el control endógeno y relativos a los obtenidos en células transfectadas con vector vacío (Con), en un total de 3 experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los resultados se comparan empleando la prueba T de Student. *p < 0.002 vs Con; † p < 0.002 vs WT.

Fig. 3: Estimación de la cantidad de melanina (medida en absorbancias/nº de célula) de células B16-F10 transfectadas con vectores pCDNA vacío (Con), pCDNA-hMC1R (WT) o pCDNA-R151-MC1R (R151C) y posteriormente expuestas a radiación UVB. Los resultados muestran la media de las absorbancias obtenidas en un total de 3 experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los resultados se comparan empleando la prueba T de Student. *p < 0.002 vs Con UVB; † p < 0.002 vs WT UVB.

Fig. 4: Resultados de proliferación (**A**) y viabilidad (**B**) de células B16-F10 transfectadas con pCDNA vacío (Con), pCDNA-hMC1R (WT) o pCDNA-R151-MC1R (R151C) y posteriormente expuestas a radiación UVB (n=3). Los resultados se comparan empleando la prueba T de Student. *p < 0.002 vs Con UVB; † p < 0.002 vs WT UVB.

Tabla 2: La tabla muestra la frecuencia de R151C en poblaciones analizadas en el proyecto 1000G.

Tabla 3: La tabla muestra los resultados de la diversidad haplotípica en el locus *MC1R* en las distintas poblaciones, indicando el valor de D de Tajima en cada caso.

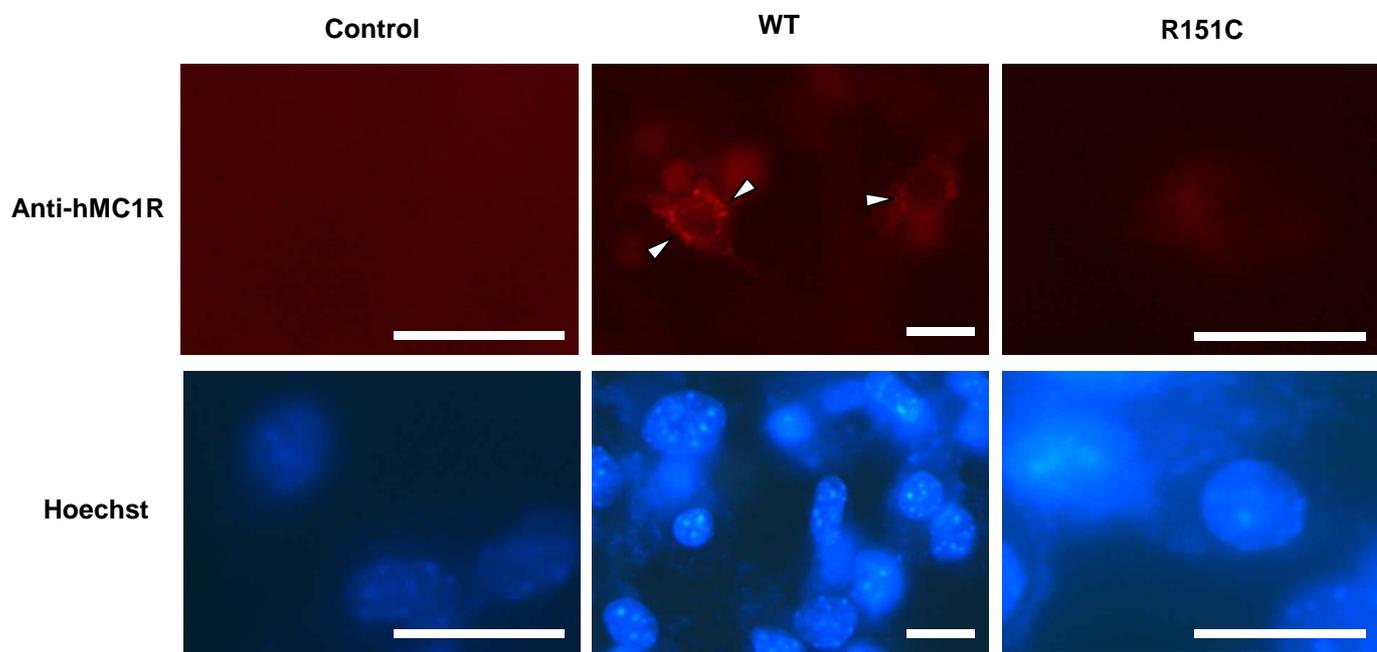


Fig. 1

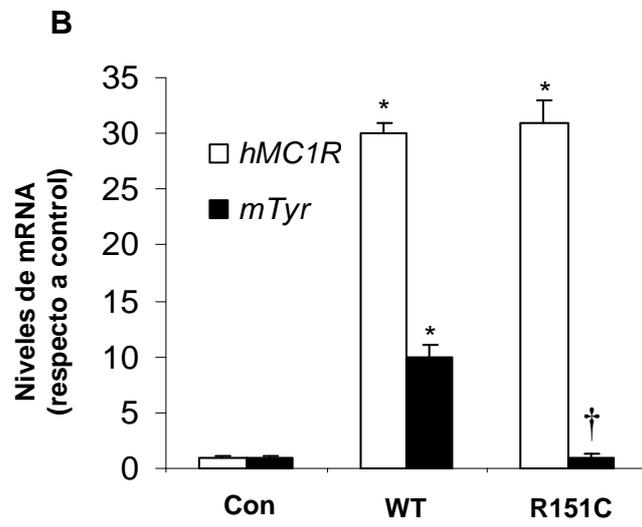
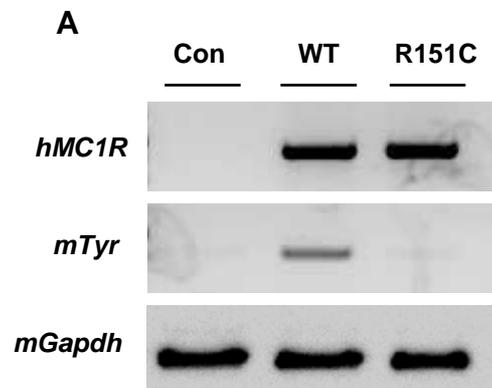


Fig. 2

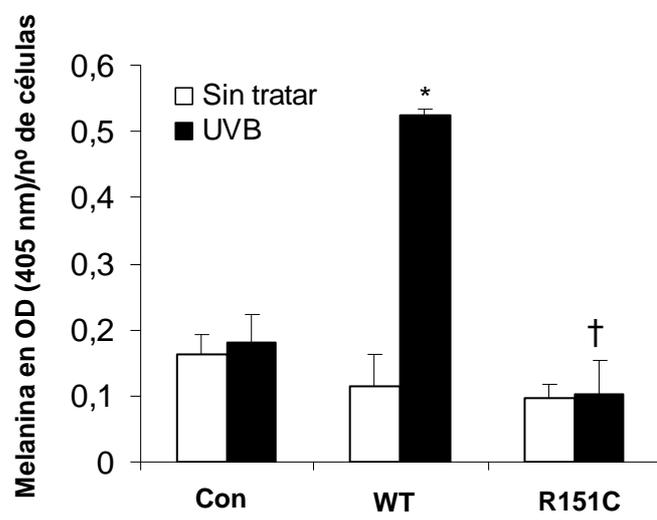


Fig. 3

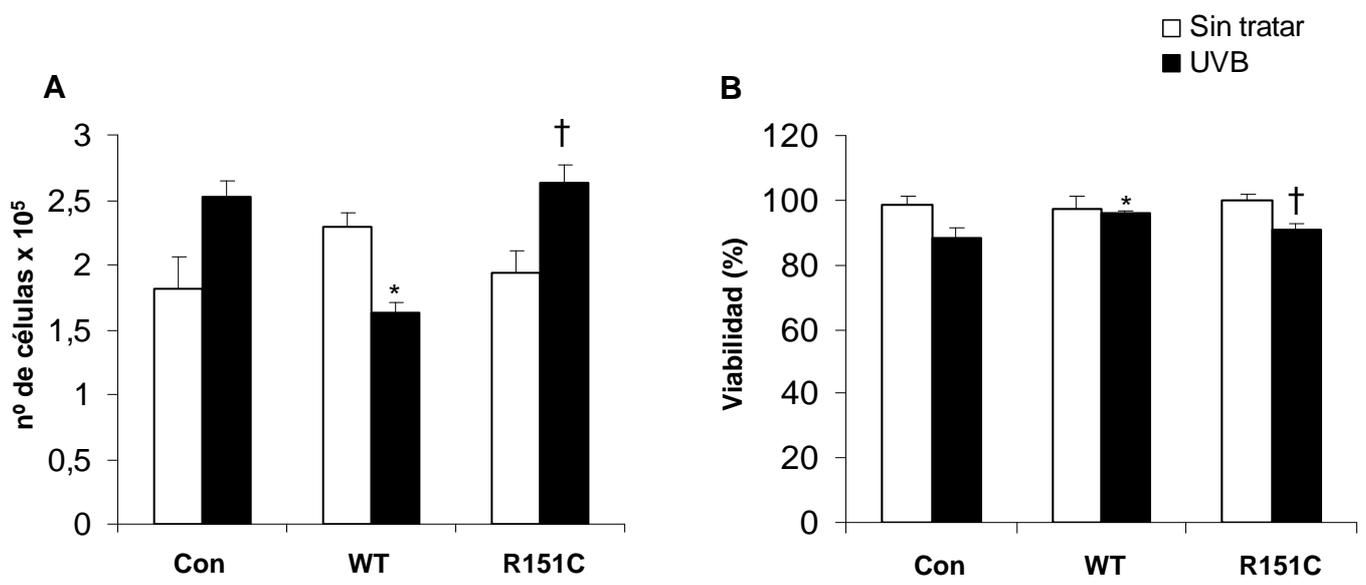


Fig. 4

Tabla 2

POBLACIÓN	FRECUENCIA de R151C
AFRICA	0.004
SUR EUROPA	0.022
NORTE EUROPA	0.091

Tabla 3

POBLACIÓN	N SECUENCIAS	DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA	TAJIMA'S D SITIOS NO-SINÓNIMOS SOLO	P-VALOR
AFRICA	492	0.661	-1.804	0.001
SUR EUROPA	224	0.578	-1.43	0.055
NORTE EUROPA	536	0.682	-0.87	0.193