

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

"Evaluación de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 como posibles marcadores de susceptibilidad genética para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, en individuos con y sin historia de exposición a arsénico. Un estudio piloto".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

Biogénica

PRESENTA

Q.F.B. LEONOR CONCEPCION ACOSTA SAAVEDRA

MÉXICO, D.F.

273186
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DESIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
SECRETARIO: DRA. PATRICIA OSTROSKY-WEGMAN
VOCAL: DRA. MA. TERESA TUSIE LUNA
SUPLENTE: DRA. MARTHA MENJÍVAR IRAHETA
SUPLENTE: DR. VICTOR HUGO BORJA ABURTO

SUSTENTANTE:

Q.F.B. LEONOR CONCEPCION ACOSTA SAAVEDRA

TUTORA:

DRA. EMMA S. CALDERON ARANDA

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
DR. FERNANDO R. ESQUIVEL GUADARRAMA
DRA. EMMA S. CALDERON ARANDA

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio y bajo la dirección de la Dra.
Emma S. Calderón Aranda, en la Sección de Toxicología Ambiental del
Departamento de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV, I.P.N.

Este trabajo fue realizado con el financiamiento de CONACYT (No.- 26300-M)
concedido a la Dra. Emma Calderón Aranda.

A mis padres, Hermilo y María Teresa, por su amor y el afán de superación que siempre me inculcaron.

Con cariño a mis hermanos María de la Paz, Hermilo y Norma Angélica siempre presentes.

A mis sobrinos: Jesús, Miguel Angel, Daniela, Hermilo, Sebastián, Fernanda, Rubén Alfonso, Andrea y Arturo, todos siempre en mi pensamiento.

Un reconocimiento especial a Maripaz por su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

a la Dra. Emma Calderón, por su amistad, dedicación sin límite y el tiempo invertido en mí. Muchas gracias.

a la Dra. Amelia Farrés González Saravia y al Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, miembros de mi Comité Tutorial, por su valiosa asesoría.

a los miembros del jurado, por sus valiosas observaciones para este trabajo.

al Dr. Victor H. Borja Aburto y el Dr. Gonzalo G. García Vargas por sus sugerencias.

al Dr. Jesús Ochoa Fierro, por su participación entusiasta en este trabajo, sin la cual no hubiera sido posible este proyecto.

a la Q. Rosantina Torres Vargas, por su valiosa colaboración en la fase de muestreo del proyecto.

al Dr. Jesús Valdés, por sus valiosos consejos.

al Q.F.B Héctor M. Debaz Vela, por su apoyo y conocimientos transmitidos para la realización de la parte experimental de esta tesis.

a mis compañeros de laboratorio Jose Alberto, Andrea, Ana Patricia, Raquel, Ma. Elena, Rubén.

al M. en C. Arístides Gómez, por su apoyo en el tratamiento estadístico del material de esta tesis.

a Eunice Vera y Carolina Aguilar, del Laboratorio de Metales, por su apoyo en la realización de las determinaciones de arsénico.

a Victor Nuñez por su apoyo técnico en el trabajo del laboratorio, y a todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

al CONACyT por la beca que me otorgó para el desarrollo de la Maestría en Ciencias, especialidad en Ciencias Bioquímicas (Registro 121716).

INDICE

Indice

Indice de tablas

indice de figuras

RESUMEN

I.	INTRODUCCION	1
1.	Cáncer	1
2.	Inmunidad a tumores	7
3.	Complejo Principal de Histocompatibilidad en Humanos (HLA)	13
	Organización de los genes HLA	13
	Moléculas HLA	
	Moléculas HLA Clase I	16
	Moléculas HLA Clase II	16
II.	ANTECEDENTES	18
1.	Cáncer de piel de tipo no melanoma	18
2.	Algunos factores asociados con el desarrollo de cáncer de piel	19
	Exposición a radiación solar	19
	Exposición crónica a arsénico	21
	Polimorfismo de genes y cáncer de piel	25
	Polimorfismo en genes de enzimas detoxificantes	27
	Polimorfismo de HLA y cáncer de piel	28
III.	JUSTIFICACIÓN	33
IV.	OBJETIVOS	36
V.	METODOLOGIA	37
1.	Diseño del Estudio	37
	Criterios de definición para cada grupo	37
	Criterios de inclusión	37
	Criterios de exclusión	38
	Variables	38
2.	Métodos	39
	Obtención de muestras biológicas	39
	Purificación de células con Ficoll-Hypaque	40
	Purificación de células por lisis con MgCl ₂	40
	Digestión con Proteinasa K	41
	Extracción con Fenol-Cloroformo	41
	Precipitación con isopropanol absoluto	42
	Cuantificación y pureza del DNA obtenido	42
	Verificación de la integridad del DNA	43
	Optimización de extracción de DNA en las condiciones del trabajo de campo	43

Determinación de la presencia de los alelos HLA-DR7, HLA-B27 y HLA-A11	43
Detección del alelo HLA-DR7	45
Detección del alelo HLA-B27	45
Detección del alelo HLA-A11	46
Detección del gene β -2 microglobulina	47
Determinación de la concentración de arsénico en agua y orina	47
Evaluación retrospectiva de la exposición a arsénico	48
Análisis de resultados	49
VI. RESULTADOS	50
Optimización de las condiciones de campo	50
Características generales de la muestra	50
Distribución por género	52
Distribución por edad	52
Evaluación molecular de la presencia de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7	54
Frecuencia de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 en la población estudiada	61
Alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 y cáncer de piel de tipo no melanoma	61
Exposición actual a arsénico	65
Exposición histórica a arsénico	67
Características de los casos y controles con historia de exposición actual a arsénico	68
Alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 en cáncer de piel no melanoma, con y sin historia de exposición a arsénico	70
Papel de otras covariables como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma	74
VII. DISCUSION	78
VIII. CONCLUSIONES	99
IX. PERSPECTIVAS	100
X. BIBLIOGRAFIA	102

INDICE DE TABLAS

TABLA I.	Antígenos tumorales que estimulan la respuesta inmune mediada por linfocitos T.	10
TABLA II.	Factores que contribuyen para la falla de la respuesta inmune hacia tumores.	11
TABLA III.	Estudios en humanos que muestran resultados controvertidos de los alelos HLA-A3, HLA-A11 y HLA-DQ3, con cáncer de piel.	30
TABLA IV.	Rendimiento obtenido de DNA con los protocolos evaluados.	50
TABLA V.	Distribución de los casos de acuerdo al diagnóstico clínico.	51
TABLA VI.	Distribución de los controles de acuerdo al diagnóstico clínico.	52
TABLA VII.	Rango de edad y edad promedio en el estudio.	54
TABLA VIII.	Frecuencia de los alelos en la muestra total.	61
TABLA IX.	Resultados del análisis logístico bivariado para el alelo HLA-A11.	62
TABLA X.	Resultados del análisis logístico bivariado para el alelo HLA-B27.	63
TABLA XI.	Resultados del análisis logístico bivariado para el alelo HLA-DR7.	64
TABLA XII.	Resultado del análisis logístico bivariado para la exposición histórica a arsénico.	67
TABLA XIII.	Resumen de las características de casos y controles con [As] por encima de los niveles permitidos en agua de bebida y en orina.	70
TABLA. XIV.	Distribución de los alelos HLA-DR7, HLA-B27 y HLA-A11 en la muestra estratificado por casos y controles y por exposición histórica a As.	72
TABLA XV.	Concentrado de casos y controles HLA-DR7 ⁺ y características relacionadas con exposición histórica a arsénico, luz solar, género y edad.	73
TABLA XVI.	Concentrado de casos y controles HLA-B27 ⁺ y características relacionadas con exposición histórica a arsénico, luz solar, género y edad. edad.	73

TABLA XVII. Concentrado de casos y controles HLA-A11* y características relacionadas con exposición histórica a arsénico, luz solar, género y edad.	74
TABLA XVIII. Resultado del análisis logístico multivariado.	77
TABLA XIX. Tamaños de muestras calculados, a partir de los datos obtenidos en este trabajo, necesarios para evaluar las asociaciones con los alelos HLA estudiados.	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Organización genómica de la región HLA.- La región HLA es un complejo poligénico.	15
Figura 2.	Diagrama de flujo de los procedimientos probados para la extracción de DNA.	44
Figura 3.	Distribución de la muestra de acuerdo a casos y controles.	51
Figura 4.	Distribución por género en casos y controles.	53
Figura 5.	Distribución por edad de casos y controles.	53
Figura 6.	Integridad del DNA genómico extraído de los pacientes.	55
Figura 7.	Análisis del producto de amplificación obtenido utilizando iniciadores específicos del gene β -2microglobulina.	57
Figura 8.	Análisis del producto de amplificación obtenido con los iniciadores específicos del alelo HLA-A11.	58
Figura 9.	Análisis del producto de amplificación obtenido con los iniciadores específicos del alelo HLA-B27.	59
Figura 10.	Análisis del producto de amplificación obtenido con los iniciadores específicos del alelo HLA-DR7.	60
Figura 11.	Distribución del alelo HLA-A11 en casos y controles.	62
Figura 12.	Distribución del alelo HLA-B27 en casos y controles.	63
Figura 13.	Distribución del alelo HLA-DR7 en casos y controles.	64
Figura 14.	Concentración de arsénico en el agua de bebida de casos y controles.	65
Figura 15.	Concentración de arsénico en orina de casos y controles.	66
Figura 16.	Distribución de los alelos HLA-DR7, HLA-B27 y HLA-A11 en casos y controles estratificados por la exposición histórica a As.	72
Figura 17.	Exposición a sol por ambiente de trabajo.	76
Figura 18.	Distribución de la población por promedio diario de exposición a luz solar.	76

RESUMEN

Actualmente existen evidencias de que el desarrollo de cáncer depende de diversos factores entre los cuales las características genéticas tienen un papel importante, y que el proceso no se expresa a menos que coexistan varios factores de riesgo. En el cáncer de piel, algunos de los factores identificados son la exposición a radiación ultravioleta, el color de la piel, el género masculino, la exposición a algunos químicos (entre éstos el arsénico), la disminución de la capacidad inmune, etc. Sin embargo, ha sido poco estudiado el papel de los factores genéticos asociados con el complejo principal de histocompatibilidad.

En este sentido, existen reportes en donde se asocia la presencia de algunos alelos HLA con el aumento en la frecuencia de cáncer de piel, de tipo no melanoma, en sujetos inmunosuprimidos con fines terapéuticos. En estas poblaciones se han identificado algunos alelos HLA clase I y Clase II, asociados tanto con protección como con riesgo.

Así también, a partir de estudios en humano y modelos experimentales se ha atribuido al arsénico un efecto inmunodepresor y se ha considerado que este estado de permisividad inmune puede favorecer la asociación de otros factores relacionados con el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma. Consideramos que estas dos condiciones, en los individuos que cuenten con un marco genético que confiera susceptibilidad para cáncer, cuando se exponen a otros factores de riesgo, resultará en una mayor probabilidad (riesgo) de desarrollar cáncer de piel.

Determinamos la frecuencia de presentación de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7, en una población de la Región Lagunera, constituida por 40 casos de cáncer de piel de tipo no melanoma y 44 controles. La población fuente fue la consulta de Dermatología del Hospital de Especialidades de la Cd. de Torreón. El objeto del estudio fue evaluar la posibilidad de establecer estos alelos como factores de susceptibilidad genética para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma. El análisis molecular de los alelos HLA-A11 y HLA-B27, HLA-DR7 no mostró ninguna asociación con el desarrollo de cáncer (OR=0.81 con $p=0.79$, OR=0.90, con $p=0.88$, OR=2.13 y $p=0.25$, respectivamente). Esto, consideramos pudiera deberse al tamaño de muestra estudiado. A partir de los resultados establecimos los tamaños

de muestra necesarios para verificar los resultados, sin la incertidumbre del tamaño de muestra. Sólo en esas condiciones será posible definir la utilidad de estos como marcadores de susceptibilidad genética para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma en la población de estudio.

Definimos que la exposición histórica a arsénico representa un factor de riesgo para cáncer de piel no melanoma, con una OR=4.39 ($p=0.005$) a partir del análisis categorizado por niveles de exposición. Finalmente, encontramos que en nuestra población, los factores que contribuyen con mayor fuerza en el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, fueron edad, género y exposición histórica a arsénico con OR=1.08 ($p=0.002$), OR=5.69 ($p=0.004$) y OR=4.27 ($p=0.028$), respectivamente.

I. INTRODUCCION

1. CANCER

El cáncer es una de las 3 causas principales de muerte en países industrializados y mientras que los tratamientos para enfermedades infecciosas y la prevención de enfermedades vasculares mejoran cada día y la expectativa del promedio de vida aumenta, el cáncer se ha convertido en una de las enfermedades más comunes y fatales. En estos países se ha planteado que alrededor de 1 de cada 5 personas muere de algún tipo de cáncer (Alberts *et al.*, 1994).

El cáncer es un crecimiento anormal de células en las cuales existe una perturbación fundamental del comportamiento y regulación del crecimiento, en el seno de un organismo multicelular. Las células cancerosas presentan dos características: 1) tanto las células como su progenie, reproducen un defecto en la regulación normal del crecimiento celular, y 2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otros tipos celulares. La combinación de ambas características hace del cáncer un proceso especialmente dañino ya que el crecimiento tumoral puede extenderse e invadir, además del tejido circundante, tejidos u órganos distantes, llevando eventualmente a la muerte del individuo (Seljelid, 1997; Alberts *et al.*, 1994).

Cuando las células anormales no invaden espacios circundantes, el crecimiento está bien delimitado, no causa daño significativo, el crecimiento se considera benigno ya que es posible alcanzar la curación total después de la resección quirúrgica del tumor. Si la proliferación de las células anormales escapa del control, invade tejidos circundantes (y

aún tejidos muy distantes) a través de la circulación linfática y sanguínea, dá lugar a tumores secundarios (metástasis), condición en la que la erradicación es muy difícil. Este tipo de tumores malignos se denominan habitualmente como cáncer (Doll and Peto, 1987; McGee *et al.*, 1992; Parkin *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1989) .

El cáncer es clasificado de acuerdo al tejido y al tipo celular de donde se origina. Los que derivan de las células epiteliales, se denominan genéricamente carcinomas y aquellos que surgen del tejido conectivo se denominan sarcomas. Los tipos de cáncer que no se contemplan en estas dos grandes categorías, incluyen a las leucemias (derivadas de células hematopoyéticas), así como los derivados de células del sistema nervioso central.

En términos generales, se ha planteado que cerca del 90 % del total de los tumores cancerosos corresponden a carcinomas. Se ha sugerido, que esto se debe a que la mayor proporción de células en proliferación se encuentra en los epitelios, y que son éstos tejidos los que con mayor frecuencia se exponen a daño por agentes físicos y químicos que favorecen el desarrollo del cáncer (Doll and Peto, 1987; McGee *et al.*, 1992; Parkin *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1989).

Cada cáncer tiene las características que reflejan su origen. Por ejemplo, las células de los carcinomas de célula basales, derivada de las células pluripotenciales de los queratinocitos de la piel, en general continúan sintetizando filamentos intermedios de citoqueratina, mientras que las células de un melanoma, derivadas de los melanocitos de la piel, frecuentemente (aunque no siempre) continúan produciendo gránulos de pigmentos. En general, los tipos de cáncer generados a partir de diferentes tipos

celulares, constituyen entidades patológicas independientes. Tomemos como ejemplo dos tipos de cáncer derivados de células de la piel, que se conoce presentan una fisiopatología específica; mientras el carcinoma de células basales raramente produce metástasis y por el contrario es un proceso local, el melanoma se disemina rápidamente y por ende es más agresivo. El primero puede resecarse quirúrgicamente, mientras que el segundo, por las extensivas metástasis, frecuentemente es imposible de extirpar y por lo tanto tiene consecuencias fatales. (Doll and Peto, 1987; McGee *et al.*, 1992; Parkin *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1989).

En el proceso de generación del cáncer se reconocen varias etapas: 1) La iniciación que comprende cambios en el DNA, en respuesta a la exposición de la célula blanco a un agente carcinogénico mutágeno. 2) La promoción, que es la fase requerida para la expansión de la clona "iniciada" y que involucra la exposición a agentes carcinogénicos pero no necesariamente mutagénicos, y 3) La progresión del tumor, que consiste en el crecimiento de la masa tumoral y que usualmente termina con el desarrollo de metástasis y por tanto de un cáncer altamente agresivo (Cotran *et al.*, 1989).

El cáncer se inicia por un cambio en la secuencia del DNA de una célula, aberración genética que será heredada de la célula anormal a la progenie. Con relación a esto, las evidencias más fuertes se han obtenido a partir de estudios con tres tipos de agentes carcinógenos y/o mutágenos, como son: agentes químicos que típicamente causan mutaciones puntuales en la secuencia nucleotídica del DNA; radiaciones ionizantes (por ejemplo rayos X), que típicamente causan rompimientos y translocaciones en los cromosomas, y agentes biológicos, como algunos virus que introducen secuencias nucleotídicas extrañas a la célula) (Nowell, 1986; Ames *et al.*, 1973; Ashby & Tennant

1988). Es importante recordar que aún cuando la mayoría de los carcinógenos son mutágenos, existe una minoría de carcinógenos sin actividad mutagénica demostrada y que se propone actúan promoviendo el desarrollo de cáncer, afectando el comportamiento de células mutantes preexistentes (Alberts *et al.*, 1994)

Actualmente se acepta que una sola mutación no es suficiente para convertir una célula saludable en una célula transformada, con la capacidad de proliferar sin control, y que el cáncer no es el resultado de un solo evento. Existen numerosas evidencias de que en la génesis del cáncer se requiere de la concurrencia, en una sola célula, de varios "accidentes" independientes que tienen un efecto acumulativo. En este sentido, los resultados de estudios epidemiológicos indican que la incidencia de cáncer aumenta en función de la edad. Si una sola mutación fuese responsable del desarrollo de un cáncer (considerando una probabilidad fija de mutación por año), lo esperado sería que el desarrollo de cáncer fuese independiente de la edad, sin embargo, en general la probabilidad de desarrollar cáncer aumenta drásticamente a partir de la 5 década de la vida. Con base en esto, ha sido propuesto que para el desarrollo de cáncer son requeridos de 3-7 eventos independientes, cada uno con baja probabilidad, para que una célula normal se transforme. También, los resultados obtenidos utilizando modelos animales transgénicos para diversas mutaciones a las cuales se les ha atribuido responsabilidad en algunos tipos de cáncer, apoyan la hipótesis de que una sola mutación no es suficiente para causar cáncer (Vogelstein, 1993).

Por otro lado, ha sido definido a partir de aquellos tumores cancerosos que tienen una causa externa identificada, que casi siempre es necesario un largo periodo de latencia entre la exposición al evento causal y el desarrollo de la enfermedad. Como ejemplo

tenemos que el cáncer de pulmón frecuentemente se presenta entre 10 a 20 años después de un consumo importante de tabaco, mientras que la incidencia de leucemias, mostró un marcado incremento sólo 5 años después de la explosión de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki. También se conoce que los trabajadores industriales expuestos ocupacionalmente por periodos de tiempo cortos a carcinógenos químicos, desarrollan cáncer "característico de su ocupación" hasta 10 - 20 años después de la exposición. No obstante este largo periodo de latencia, se sabe que durante este tiempo, las células alteradas experimentan una serie de cambios sucesivos que finalmente dan lugar al crecimiento del cáncer, aunque el diagnóstico se realiza en estadios relativamente tardíos. Un ejemplo de lo anterior es lo ocurrido en el cáncer cérvico-uterino, un carcinoma que deriva del epitelio cervical que tiene una organización similar a la de la epidermis de la piel. Normalmente la proliferación ocurre sólo en la capa basal del tejido, generando células que se "desplazan" hacia la superficie, diferenciándose en células aplanadas (ricas en queratina), que no se dividen y que finalmente se descaman. Cuando se desarrolla displasia, las células capaces de proliferar no son confinadas a la capa basal y presentan un proceso de diferenciación desordenado. Las células descamadas en la superficie se encuentran en estadios anormales de diferenciación, presentándose como parches displásicos que frecuentemente pueden tener una regresión espontánea, aunque con menor frecuencia pueden progresar, en el transcurso de varios años, a lo que se denomina carcinoma *in situ*. Este presenta un patrón de división celular y diferenciación con alteraciones más severas en donde todas las capas del epitelio tienen células indiferenciadas, en proliferación activa y con cariotipo y tamaño variable; las células anormales sin embargo, permanecen confinadas en la cara epitelial de la membrana basal. En este

estadio, la resección quirúrgica del tejido anormal permite la curación completa. Sin el tratamiento, el tejido anormal puede permanecer dañado o presentar una regresión espontánea, pero de 20 a 30 % de los casos, en un periodo de varios años pueden progresar a un verdadero carcinoma maligno cuyas células cruzan la lámina basal del epitelio y se diseminan al tejido conectivo (Alberts *et al.*, 1994).

Mecanismos genéticos moleculares asociados con el desarrollo de cáncer.- En el proceso de generación del cáncer se han observado cambios secuenciales como mutaciones en genes que codifican para proteínas regulatorias del crecimiento celular, cambios en la morfología, en el crecimiento de las células, en la dependencia hormonal, de los patrones enzimáticos y en la expresión de antígenos de superficie (Fearon, 1990; Solomon, 1991).

En términos generales, dos clases de genes son críticos en la génesis del cáncer: los genes supresores de tumores y los proto-oncogenes. Las mutaciones que resultan en una alteración en la regulación de los proto-oncogenes, generalmente estimulan a las células a mantenerse proliferando activamente, aún en condiciones en las cuales no deberían hacerlo. Estas mutaciones tienen un efecto dominante, y los genes mutados, conocidos como oncogenes, pueden identificarse por su habilidad en transformar el comportamiento de las células en las cuales son introducidos (Bishop, 1991; Brugge *et al.*, 1991; Harris, 1986; Varmus and Weinberg, 1993). Los eventos genéticos básicos que pueden convertir un proto-oncogene en oncogene son: 1.- Mutaciones puntuales o deleciones en la secuencia de DNA; esto puede resultar en que las proteínas codificadas sean hiperactivas, alteradas o truncadas, pero con función anormal.

2.- Amplificación génica, en la que el gene puede sobreexpresarse debido a una elevada amplificación del número de copias a través de errores en el proceso de replicación cromosómica. 3.- Re-ordenamiento del cromosoma, por inserción de un elemento genético móvil, (ej. secuencias de DNA viral o como resultado de translocaciones cromosómicas). Esto también resulta en sobre-expresión del producto codificado.

Las mutaciones que resultan en la pérdida de la función de los genes supresores de tumores, relevan a las células alteradas de los mecanismos que inhiben su proliferación. Normalmente las mutaciones en genes supresores de tumores son recesivas en su efecto sobre una célula individual y no se produce pérdida del control hasta que ambas copias del gene se encuentren inactivadas. Sin embargo, la pérdida de una copia de un gene supresor de tumores (pérdida de heterocigosidad) puede generar una predisposición hereditaria al cáncer, ya que es suficiente una sola mutación somática que elimine la copia correcta del gene que se conserva, para iniciar el proceso (Haber *et al.*, 1991; Knudson ,1985; Weinberg, 1991; Weinberg,1990; Weinberg, 1988).

2. INMUNIDAD A TUMORES.

En general se ha propuesto que el desarrollo de cáncer y la progresión a la muerte, se facilita cuando los sistemas de protección del individuo (incluyendo al sistema inmune) no son capaces de erradicar el crecimiento de éste. El paradigma implícito presupone que existe una distinción fundamental entre el tumor y el hospedero y que mientras el tumor tiende a crecer, el hospedero trata de contener este crecimiento a partir de la actividad funcional de sus sistemas de protección que involucran tanto la actividad de la respuesta inmune específica [linfocitos Th (T cooperadores) , Tc (T citotóxicos) y B],

así como la protección no específica mediada por las células asesinas naturales (natural killer), los macrófagos y los mecanismos de protección regulada por las células mesenquimatosas (Seljelid, 1997).

A partir de datos recientes es cada vez más claro que los mecanismos inmunes mediados por los linfocitos Tc, están involucrados en la protección inmune específica en contra de tumores. En estos mecanismos juegan un papel muy importante las moléculas de histocompatibilidad, que median la presentación de los antígenos extraños y que participan en la activación de las células T. Estas moléculas de histocompatibilidad, son críticas para la inducción y la calidad de la respuesta inmune (Janeway & Travers, 1996).

Actualmente y a partir de datos generados de estudios en modelos experimentales, se ha definido que para que la respuesta inmune sea competente para la detección y por ende en la eliminación de tumores, es un requisito necesario e indispensable que las células T reconozcan una molécula (antígeno) expresado específicamente en las células tumorales, como un antígeno no propio. Así, en la medida que las células transformadas expresen antígenos diferentes al repertorio normal del individuo, en esa medida la respuesta inmune será más eficiente para detectar y responder contra el antígeno tumoral, y en consecuencia de destruir las células portadoras de dicho epitopo. Como "antígenos tumorales específicos", se han identificado proteínas citoplásmicas mutadas (neoantígenos) y antígenos extraños (como los virales). Otros antígenos tumorales pueden ser marcadores normales de la superficie celular, pero que se expresan a niveles anormalmente altos en las células transformadas, o antígenos embrionarios que se expresan extemporáneamente en las células tumorales, pero no

en las células u órgano del cual se originó el tumor. También como antígenos tumorales pueden expresarse antígenos que habitualmente se encuentran en tejidos u órganos "privilegiados" (por ejemplo los presentes en los testículos, en placenta o en el ojo). Estos "antígenos privilegiados", en condiciones normales no están en contacto con el sistema inmune y por lo tanto no generan tolerancia en los estadios de maduración en los cuales este proceso tiene lugar (Janeway & Travers, 1996). En la tabla I se muestran algunos de los antígenos tumorales que se han identificado y que son capaces de inducir la respuesta de linfocitos T.

La capacidad del sistema inmune para responder y destruir a los tumores, depende de manera general de factores relacionados tanto con el hospedero como del tumor. En la Tabla II, de manera resumida se presentan algunos de los principales factores. Con relación a esto y debido al interés del presente proyecto, brevemente mencionaremos los mecanismos relacionados con la expresión de las moléculas de histocompatibilidad (HLA en humanos por sus siglas del inglés - Human Leukocyte antigens-).

Para la inducción de la respuesta inmune específica hacia un antígeno, es requisito necesario e indispensable cumplir tres condiciones: 1) Que exista un antígeno extraño e inmunogénico, 2) Que exista en el repertorio de los receptores de antígeno de los linfocitos T (TCR), la especificidad requerida para el reconocimiento del antígeno "extraño", y 3) Que exista la molécula HLA y en densidades suficientes, capaz de presentar el epitopo extraño y de estimular eficientemente la respuesta inmune. Considerando lo anterior es posible entender el importante papel que las

TABLA I.- Antígenos tumorales que estimulan la respuesta inmune mediada por linfocitos T.

Categoría	Ejemplos
Antígenos específicos de tumores inducidos químicamente (ej. en sarcomas de ratón).	No caracterizados molecularmente.
Productos de mutaciones al azar en genes no involucrados en la patogénesis de cáncer.	Mutación en p19A en mastocitoma murino obtenido por mutagénesis. Ag. de melanoma MUM-1 por mutación de Ser→Ile, reconocido por linfocitos Tc específicas de melanoma.
Productos de oncogenes.	Proteína p21ras con mutaciones puntuales en el residuo 12 (≈10 % de carcinomas humanos). Rearreglo en el producto p210 de <i>bcr-abl</i> (en leucemias mielógenas crónicas). Sobre-expresión del gene normal <i>HER-2/neu</i> (en varios carcinomas).
Mutación de productos de genes supresores de tumores.	p53 (≈50 % de tumores humanos).
Productos de genes silenciosos, normalmente no expresados en la mayoría de los tejidos.	MAGE 1, -3, BAGE, GAGE (expresados por melanomas humanos y otros tipos de carcinomas. Se expresan en testículo normal y placenta (tejidos privilegiados).
Productos de genes de virus asociados a neoplasias.	Ag. SV40 T (Tumores inducidos por SV40) Productos de genes E6 y E7 de papilomavirus humano (carcinoma cervical humano). Producto del gene EBNA-1 del virus de Epstein-Barr (Linfoma de Burkitt's y carcinoma nasofaríngeo).
Productos de genes tejido específicos, expresados por las células normales de donde se deriva el tumor.	Tirosinasa, gp100 y MART-1 (expresados exclusivamente por melanocitos y melanomas).

Ag: Antígeno; SV: Simian Virus; EBNA: Epstein-Barr Nuclear Antigen; MAGE, GAGE, GAGE, familias de genes que codifican para antígenos de melanoma. Adaptada de Pardoll, 1993.

TABLA II- Factores que contribuyen para la falla de la respuesta inmune hacia tumores.

I. Relacionados con el hospedero
1.- Falla del hospedero para responder a los antígenos tumorales.
<ul style="list-style-type: none"> a) Supresión o deficiencia inmune debido a carcinógenos (físicos o químicos), infecciones, edad (ancianos y niños). b) Deficiencias en la presentación de los antígenos tumorales por parte de las células presentadoras de antígeno. c) Fallas de los mecanismos efectores del hospedero (células o factores solubles) para alcanzar las células tumorales .
II. Relacionados con las células tumorales
1.- Falla del tumor para ser reconocido
<ul style="list-style-type: none"> a) Carencia de epitópos antigénicos b) Carencia de moléculas HLA de clase I en la célula tumoral. c) Enmascaramiento de los antígenos tumorales. d) Resistencia del tumor a los factores tumoricidas.
2.- Falla del tumor para inducir una respuesta inmune adecuada:
<ul style="list-style-type: none"> a) Disminución de antígenos HLA o antígenos tumorales b) Producción, por parte del tumor, de sustancias inhibitorias de citocinas. c) Desbalance entre la inducción de la respuesta y el crecimiento del tumor.

Adaptada de Schreiber, 1993.

moléculas de HLA tienen para inducir y regular la respuesta inmune en general y la dirigida a tumores en particular.

Con relación a esto, los mecanismos generales de la respuesta antitumoral en la cual participan las moléculas de histocompatibilidad (ver tabla II), se mencionan en seguida:

1.- Los tumores pueden regular negativamente la expresión de las moléculas HLA (clase I). La demostración de la importancia de este mecanismo ha sido obtenida a partir de estudios en los cuales el incremento en la expresión de las moléculas HLA clase I (por ejemplo por la transfección de genes), resulta en un aumento en la inmunogenicidad de las células tumorales, y por ende en la disminución de su tumorigenicidad *in vivo*, e inclusive previene el crecimiento en modelos de transplantes de tumores. Entre los tumores en los que se ha definido se altera la expresión de las moléculas HLA, se encuentran los asociados a infecciones virales, proponiéndose que por tal razón las células transformadas son incapaces de presentar los antígenos virales (tumorales) a las células Tc.

2.- Aún cuando los tumores expresen moléculas de histocompatibilidad clase I, (además de antígenos tumorales inmunogénicos), la respuesta inmune puede ser ineficiente debido a 2 razones principales: 1) Cuando las células tumorales no expresan en su superficie moléculas de histocompatibilidad clase II (normalmente presentes en las células APC profesionales), o no existe un importante infiltrado de células APC en el sitio del tumor; esto impide la activación de linfocitos Th y por lo tanto la activación de los linfocitos Tc también es ineficiente. 2) La carencia de moléculas coestimuladoras en las células tumorales (la mayoría de los tumores derivan de tejidos que no expresan éstas), favorece que sin la cooperación de las células Th, el

reconocimiento de los antígenos tumorales por parte de los linfocitos Tc, resulte en anergia clonal de los linfocitos Tc específicos del tumor (McMichael & Bodmer, 1992; Guardiola *et al.*, 1993; Janeway & Travers, 1996).

3.- Recientemente, ha sido sugerido que la presencia de ciertos tipos de alelos de histocompatibilidad, pueden favorecer el desarrollo de algunos tipos de cáncer debido a que presentan ineficientemente algunos antígenos tumorales de cáncer asociados con infecciones virales del tipo de papilomavirus (Bavinck *et al.*, 1994).

3. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN HUMANOS (HLA)

Organización de los genes HLA

El Complejo Principal de Histocompatibilidad, se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y está constituido por diversos *loci* cercanos entre sí. La organización de los genes de HLA se presenta en la Figura 1.

La región HLA es un complejo poligénico, que ocupa cerca de 3500 kilobases y contiene tres subregiones denominadas HLA clase I, Clase II y Clase III. De estas, nuestro interés se centrará en Clase I y Clase II. La región para Clase I comprende tres *loci*: HLA-B, HLA-C y HLA-A. La región de HLA Clase II contiene 3 *loci*: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (Hansen *et al.*, 1993).

Los genes HLA son altamente polimórficos y como consecuencia existen numerosas alelos en la población humana. Para Clase I se han reportado los genes distribuidos como se indica: Para el *loci* HLA-A existen 66 alelos, para el *loci* HLA-B existen 147 alelos, y 35 alelos para el *loci* HLA-C (Arnett *et al.*, 1995).

Para Clase II hasta 1995, se reportaron los genes indicados en seguida: Para el *loci* HLA-DRB existen 177 alelos y 18 para HLA-DQA1. Para el *loci* HLA-DQB1 existen 29

alelos mientras que existen 8 para HLA-DPA1. Finalmente, para el *loci* HLA-DPB1 existen 69 alelos (Marsh *et al.*, 1995).

Los genes HLA se expresan de manera codominante y codifican para proteínas membranales de dos diferentes tipos denominadas moléculas HLA Clase I y Clase II de acuerdo al *loci* en el cual se localiza los genes que las codifican. Las moléculas correspondientes a cada alelo difieren en su habilidad de unir y presentar diferentes determinantes antigénicos.

Moléculas HLA.

Las moléculas de HLA, son proteínas membranales que de acuerdo a las rutas biosintéticas y de ensamblaje que siguen, se determina el origen de los epitopos peptídicos "extraños" asociados con cada una de ellas. En general las moléculas de clase I presentan antígenos sintetizados endógenamente (virales, tumorales, etc.), mientras que las de clase II presentan antígenos exógenos (Babbitt *et al.*, 1985, Townsend *et al.*, 1986). Los epitopos reconocidos por las moléculas de histocompatibilidad, son epitopos peptídicos secuenciales generados por proteólisis de los antígenos nativos. Estos epitopos, cuando se asocian a las moléculas de histocompatibilidad son transportados a la superficie celular en donde los complejos HLA-epitopo son reconocidos por el TCR específico para el epitopo. La presentación de los antígenos extraños a los linfocitos Tc, se realiza mediante las moléculas HLA clase I, mientras que las moléculas de clase II presentan a los linfocitos Th. Este evento es un paso clave en la respuesta inmune del individuo y le permite discernir los antígenos propios de los no propios (Hansen *et al.*, 1993).

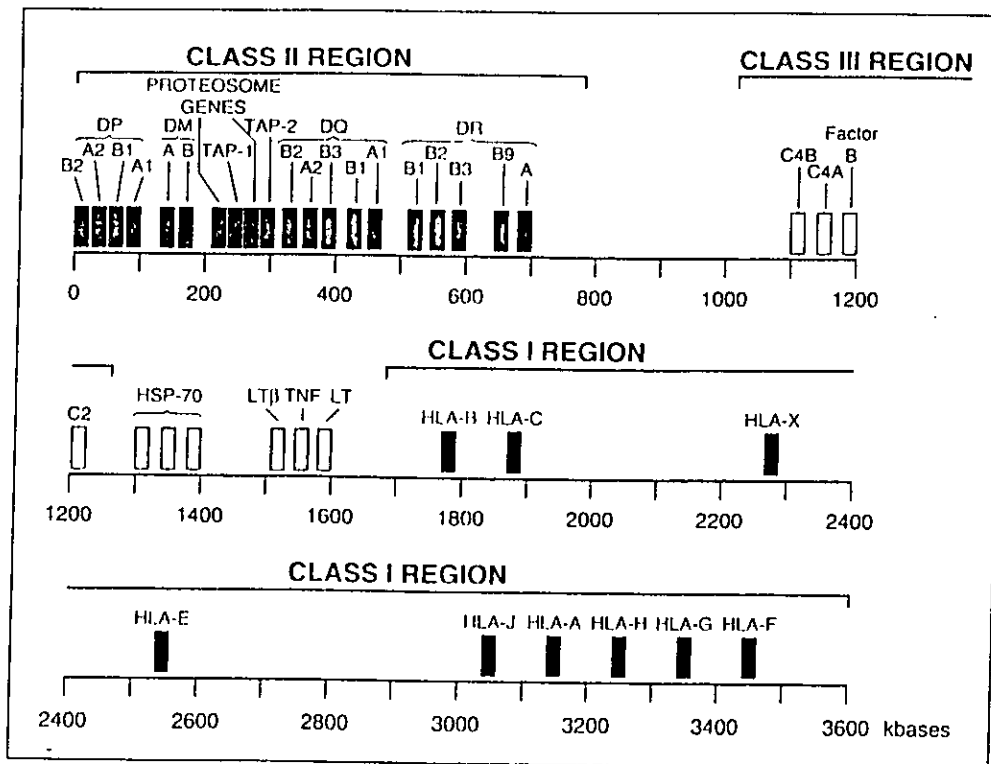


Figura 1.- Organización genómica de la región HLA.- La región HLA es un complejo poligénico, que ocupa cerca de 3500 kilobases y contiene tres subregiones denominadas HLA clase I, Clase II y Clase III. Locí HLA Clase II.

Se localiza en la región proximal al centrómero del brazo corto del cromosoma 6. Contiene los genes HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. La nomenclatura de los genes de Clase II, inician con la letra D, seguidos de la inicial correspondiente a la subregión (P, Q, o R), y de la letra A si son genes para la cadena α , ó B si corresponden a genes para la cadena β . Cuando existe más de un gene para las cadenas, se agrega un número (WHO, 1992).

Las sub-regiones HLA-DR y HLA-DQ se encuentran separadas por 80-300 kb y ciertos alelos de estas regiones se presentan en el mismo haplotipo con una frecuencia mayor a lo esperado. La sub-región HLA-DP está separada por 800 kilobases de la sub-región HLA-DQ y consecuentemente algunos alelos también se segregan juntos.

A partir de estudios de mapeo genético de la región Clase II se definió la existencia de dos o tres genes funcionales para la cadena β de algunas moléculas de Clase II y sólo un gene para la cadena α . El uso de más de una cadena β permite a algunas moléculas de clase II, especialmente HLA-DR, ser expresadas en más de dos formas alélicas en una misma célula. Esto constituye una importante diferencia entre moléculas de Clase I y de Clase II. Para la Clase II, en un individuo heterocigoto se expresan 6 diferentes alelos. Debido a la existencia de más de un gene para la cadena β , es posible la formación de diferentes heterodímeros $\alpha\beta$. De forma general, los individuos potencialmente podrían expresar de 10 a 20 productos resultantes de la expresión de los genes de Clase II. La región de Clase III se ubica en seguida de la región Clase II. Los genes identificados en esta región incluyen a factores del complemento y la enzima 21-hidroxilasa.

Locí Clase I. La región de Clase I comprende un segmento de aproximadamente 1600 kb, situado después de la región de Clase III. Las subregiones de Clase I son: HLA-B, HLA-C y HLA-A. Existen además genes Clase I no clásicos (HLA-E, HLA-F Y HLA-G), además de 11 pseudogenes. El mejor caracterizado de estos es HLA-H, que es similar a HLA-A, pero inactivo debido a la ausencia de una cisteína invariante en la posición 164 que se requiere para la formación de un puente disulfuro crítico del dominio $\alpha 2$ y una delección puntual en el codón 227, que produce una proteína con un plegamiento incorrecto de la región COOH-terminal. Los genes HLA, se expresan de manera codominante. Para Clase I un individuo heterocigoto expresa 6 diferentes alelos polimórficos (tres de cada uno de los padres) y 6 diferentes clases de moléculas HLA por célula.

(Adaptada de Hansen et al., 1993 & Abbas et al. 1997).

Molécula HLA Clase I. La unidad estructural consiste de una cadena pesada de 44 kDa, codificada en la región HLA y una cadena ligera de 12 kDa, β -2microglobulina (codificada en el cromosoma 15) (Goodfellow *et al.*, 1975). La cadena pesada del heterodímero atraviesa la membrana de la célula, en su segmento proximal al extremo COOH-terminal, mientras que el extremo NH₂-terminal se orienta hacia la superficie externa de la membrana plasmática de la célula. La porción extracelular de la cadena pesada se divide en 3 dominios globulares: α 1, α 2 y α 3, cada uno de los cuales está compuesto de \approx 90 aminoácidos. La molécula β -2microglobulina está asociada con el dominio α 3, mientras que los dominios α 1 y α 2, que corresponden a las secuencias genómicas más polimórficas de esta molécula, constituyen la hendidura de unión para los epitopos que son presentados a los TCR de los linfocitos Tc (Hansen *et al.*, 1993).

Molécula HLA Clase II. Es una proteína heterodimérica transmembranal formada por una cadena α y una cadena β . Ambas cadenas: α (33-35 kDa) y β (26-28 kDa) son codificadas dentro del *loci* HLA y ambas cadenas están orientadas con su extremo NH₂-terminal hacia fuera de la célula.

Las cadenas α y β están divididas en dos dominios globulares extracelulares de 90-100 aminoácidos llamados α 1, α 2, y β 1, β 2. Los dominios α 2 y β 2 se unen a la membrana a través de un segmento de 10 a 12 aminoácidos altamente hidrofílico que une los dominios extracelulares con la porción transmembranal (de 20 a 25 aminoácidos hidrofóbicos) y a través de éste, con un segmento citoplásmico de 8-15 aminoácidos. La mayor parte del polimorfismo exhibido por esta molécula se concentra en los

dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, que conforman la hendidura de unión para el epitopo reconocido por los TCR (Hansen *et al.*, 1993).

II.- ANTECEDENTES

1. CÁNCER DE PIEL DE TIPO NO MELANOMA

El cáncer de piel constituye un problema de salud pública en el mundo. Para cáncer de piel de tipo no melanoma, solamente en los Estados Unidos de Norteamérica la incidencia estimada para 1994 fue de 900,000 a 1,200,000 de casos, lo que representó un incremento de 300,00 casos/ año, con respecto a la incidencia reportada 5 años antes (Mukhtar y Elmets, 1996). En este tipo de cáncer se incluyen los carcinomas de células escamosas (SCC) y los de células basales (BCC).

Cáncer de células escamosas. Se desarrolla a partir de los niveles superiores de la epidermis y contribuye con el 20 % de todos los tipos de cáncer de piel. Aparece comúnmente en áreas expuestas al sol como la cara, orejas, cuello, labios y el dorso de las manos. Puede también desarrollarse en cicatrices o úlceras de la piel situadas en cualquier parte del cuerpo, y de manera menos frecuente en el área genital. Tiende a ser más agresivo que el cáncer de células basales, pues invade más fácilmente tejidos debajo de la piel y tejidos distantes. Aún así, menos del 1 % de los carcinomas escamosos de piel se esparcen hacia nódulos linfáticos y otros órganos (ASC, 1998).

Cáncer de células basales. Se origina en la capa inferior de la epidermis, llamada capa de células basales. Cerca del 75 % de todos los carcinomas de piel son carcinomas de células basales. Este tipo de cáncer se desarrolla también en áreas expuestas al sol, especialmente en la cabeza y el cuello. Crece lentamente y no es usual que se extienda a otros tejidos, sin embargo, si no se aplica tratamiento oportuno

puede crecer e invadir áreas cercanas como huesos y otros tejidos. El 35-50% de los pacientes diagnosticados con cáncer de células basales desarrollan un nuevo cáncer de piel dentro de los primeros cinco años posteriores al primer diagnóstico (ASC, 1998).

2. ALGUNOS FACTORES ASOCIADOS CON EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PIEL.

Exposición a radiación solar.

Las exposiciones repetidas a la radiación solar resultan en formas específicas y prematuras de envejecimiento de la piel y en la inducción de queratosis actínicas, carcinomas de células basales, carcinomas de células escamosas y melanomas malignos. La exposición a luz solar, [radiación ultravioleta (UV) especialmente la B (UVB)], es un factor de riesgo para cáncer de piel, que cada vez adquiere mayor importancia debido a dos factores: 1) en humanos se utilizan, con motivos cosméticos, cada vez con mayor frecuencia lámparas de bronceado cuya radiación es esencialmente UVA, aunque también está contaminada con radiación UVB, y 2) la exposición a radiaciones UVB (por luz solar), es cada vez mayor en la población en general debido a la mayor penetración de los rayos UVB a la superficie de la tierra, como consecuencia del deterioro de la capa de ozono (Kevin, 1996).

Estudios realizados en pacientes inmunosuprimidos, con fines de trasplante de órganos o por otras razones, y con historia de exposición a la radiación solar, han demostrado que existe un aumento en la incidencia de queratosis actínicas, queratoacantomas y carcinoma de células escamosas. Con base en evidencias de este tipo se ha sugerido que la presencia de alteraciones en el sistema inmune, es un factor

importante en el desarrollo de estas patologías (Kevin, 1996). En este sentido, existen estudios realizados en su mayoría en células humanas que han proporcionado la siguiente información:

Las células de Langerhans (LC), que al igual que los queratinocitos y melanocitos están altamente expuestos al daño por la luz UV, generan señales de activación en un lapso de horas a días posteriores a la exposición. Se ha planteado que, los primeros eventos que se activan en respuesta a la exposición a UVB, ocurren a nivel de receptores membranales (como el receptor del factor de crecimiento epidérmico), de la transducción de señales y sobre eventos intracelulares en donde se fosforilan diferentes tirosina-cinasas, se activan Raf y Ras y se disocia el complejo NF- κ B. Todos estos eventos resultan en la producción de citocinas como IL-1, TNF- α , IL-6 y GM-CSF, así como en la expresión de genes involucrados en la detención del ciclo celular y en el proceso de apoptosis, ambos responsables de la regulación de la proliferación en células con daño en el DNA (Kevin, 1996).

También se ha reportado que se induce la cascada del ácido araquidónico que resulta en la activación de los mastocitos y los queratinocitos, que rápidamente se degranulan liberando histamina y otros productos. También se ha definido que como consecuencia de la exposición a UVB, se produce una disminución en el contenido y nivel de activación de las células de Langerhans de la epidermis, necrosis de los queratinocitos y engrosamiento de la capa de células endoteliales. Además se ha observado que la exposición experimental de cultivos de órganos a luz UVB, produce liberación de TNF- α e inducción subsecuente de ELAM-1, una molécula de adhesión en la superficie del endotelio, utilizada por los leucocitos para movilizarse hacia la piel. Esto se ha

correlacionado con la subsecuente infiltración de macrófagos y de neutrófilos en la piel quemada por el sol, proceso que comienza 6 horas después de la exposición y alcanza su pico máximo a los 3 días (Kevin, 1996).

Además de lo anterior, se ha observado que la exposición a la luz UVB altera la presentación de antígenos. A este respecto la exposición de un sitio de inmunización a irradiación con UVB, *in vivo*, se ha demostrado altera la capacidad de montar respuesta de sensibilidad por contacto, un proceso dependiente de la capacidad funcional de las células APC, (Elmets, 1983, Tamaki *et al.*, 1981) y se ha propuesto que esto ocurre debido a la inducción de tolerancia. (Toews *et al.*, 1980).

Exposición crónica a arsénico.

Para el desarrollo de cáncer de piel, actualmente se conoce que la exposición a compuestos químicos constituye un importante factor de riesgo. Entre éstos, el que cada vez se asocia con mayor frecuencia al desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, es la exposición crónica a arsénico en su forma inorgánica (Rupinder *et al.*, 1992).

De hecho, el arsénico es uno de los pocos carcinógenos del grupo 1A de acuerdo a la clasificación de la EPA (IARC, 1980). Esto con base a que en humanos existen suficientes evidencias de que provoca cáncer en diferentes órganos: en trabajadores ocupacionalmente expuestos por vía inhalatoria, se ha documentado el desarrollo de cáncer de pulmón (Cuzick, 1982; Pershagen, 1981; Rupinder *et al.*, 1992), mientras que estudios realizados en poblaciones expuestas a arsénico a través de agua de bebida (con niveles de 0.8 y 2.6 ppm) se ha mostrado asociación con cáncer de hígado, vejiga, riñón (Brown, 1995) y una mayor frecuencia de cáncer de piel de tipo no melanoma, en

especial de cáncer de células escamosas (Yeh, 1973, Chen *et al.*, 1985, Cebrian *et al.*, 1983).

Actualmente, en el mundo las fuentes más importantes de exposición a arsénico son: a) la ocupacional, que ocurre principalmente en trabajadores de plantas fundidoras de metales e industrias productoras de microcircuitos (Rupinder *et al.*, 1992), y b) la ambiental, que ocurre por la ingestión de agua contaminada, ya que el arsénico es un componente natural del suelo de algunas zonas geográficas, y por lixiviación contamina las fuentes de abastecimiento de agua localizadas en el subsuelo de dichas regiones. En regiones de Asia, como Taiwan y Japón, y de América, como Argentina y México (Rupinder *et al.*, 1992 y Cebrián *et al.*, 1983), se ha demostrado niveles de arsénico que exceden los límites de 0.05 ppm permisibles de acuerdo a la ATSDR (ATSDR, 1989).

Con relación al cáncer de piel asociado a la exposición crónica a arsénico, las lesiones que comúnmente se observan son carcinomas múltiples de células escamosas, que parecen desarrollarse a partir de zonas de hiperqueratosis, especialmente de cuernos hiperqueratósicos, aunque también puede ocurrir carcinoma múltiple de células basales, no asociadas a la lesiones de hiperqueratosis (ATSDR, 1998).

Los mecanismos involucrados en la generación de cáncer de piel en individuos expuestos a arsénico no están bien definidos ya que en los estudios realizados en sistemas bacterianos y en modelos animales no se ha podido demostrar un efecto carcinogénico, aunque las evidencias en humanos no están en duda. Se ha sugerido

que entre los posibles mecanismos de carcinogénesis del arsénico pudieran incluirse los siguientes:

Diferentes evidencias experimentales apoyan la idea de que el arsénico inhibe una o más de las enzimas involucradas en la replicación o reparación del DNA dañado, actuando como un inhibidor de la DNA ligasa (Li *et al.*, 1991; Okui and Fujiwara, 1986; Schaumloffel and Gebel, 1998). A partir de otros estudios se ha sugerido que el arsenato se incorpora en lugar del fosfato en el DNA, formando ésteres inestables con el DNA (Nordberg and Andersen, 1981). En 1992, Yang y col. sugirieron que el arsenito de sodio puede interferir con los procesos de fijación de mutaciones de los dímeros de timina y de citosina timina (TT y CT), durante la replicación del DNA en piel expuesta a la luz ultravioleta, basándose en resultados obtenidos a partir de estudios realizados en células de ovario de hamster (Yang *et al.*, 1992). Estos resultados apoyan el efecto comutágeno del arsenito de sodio con luz ultravioleta, sugerido por Rossman en 1981, a partir de estudios realizados en *Escherichia coli* (Rossman, 1981).

También se ha propuesto que el efecto "carcinogénico" del arsénico puede estar relacionado con los procesos enzimáticos de detoxificación del arsénico por el organismo, el cual utiliza la S-adenosilmetionina (SAM) para su metilación y posterior eliminación: el hecho de que las metiltransferasas del DNA requieran el mismo donador de grupos metilos (SAM) sugiere que el arsénico puede inducir hipometilación del DNA al consumir SAM, lo cual facilitaría la expresión aberrante de genes (Zhao *et al.*, 1997; Mass and Wang, 1997). Además se ha sugerido que el arsénico (III) estimula la actividad de AP-1, el cual inhibe la actividad de JNK y éste a su vez activa la expresión de los proto-oncogenes c-fos y c-jun, lo que permite la promoción tumoral (Cavigelli *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que en cultivos primarios de queratinocitos expuestos a arsénico (III) se incrementa la proliferación celular vía la producción de factores de crecimiento derivados de queratinocitos como GM-CSF y el TGF- α (Germolec *et al.*, 1996). Consistente con esos hallazgos, se ha reportado un aumento en el RNA mensajero del GM-CSF y del TGF- α , en piel clínicamente normal de ratones expuestos a arsénico por 10 semanas y en lesiones de piel de humanos expuestos crónicamente a este xenobiótico. Los autores de los resultados sugieren que el arsénico probablemente aumenta el desarrollo de neoplasias de piel por estimulación crónica de factores de crecimiento derivados de queratinocitos (Germolec *et al.*, 1997).

Otro factor, que se ha propuesto potencialmente puede contribuir para la propagación de células cancerosas se relaciona a la capacidad inmunotóxica de este metaloide. En este sentido, estudios realizados en modelos animales (Sikorski 1991 a y b) y en humanos (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991, Gonsebatt *et al.*, 1992 y Gonsebatt *et al.*, 1994), han mostrado que la exposición crónica a arsénico induce alteraciones en la proliferación y activación de los linfocitos (especialmente los linfocitos T). Los mecanismos responsables del efecto inmunotóxico aún no están bien definidos, pero se ha sugerido puede relacionarse con el estado funcional del gene supresor de tumores p53, que también se ha propuesto, pudiera estar involucrado en el mecanismo de carcinogénesis del arsénico (Gonsebatt *et al.*, 1992; Salazar *et al.*, 1997).

Polimorfismo de genes y cáncer de piel.

Actualmente se sabe que en una población expuesta a los diferentes factores de riesgo para cáncer, existen individuos con diferentes grados de susceptibilidad para desarrollar lesiones cancerosas.

Para cáncer de piel, evidencias obtenidas por diversos autores sugieren que el polimorfismo de genes involucrados en la pigmentación de la piel puede jugar un papel importante en la susceptibilidad a cáncer inducido por luz UV (Toews *et al.*, 1980, Streilein *et al.*, 1988, Yoshikawa *et al.*, 1990, Vermeer *et al.*, 1991). Las evidencias sobre la participación de otros genes, diferentes a los que determinan la pigmentación de la piel, fueron inicialmente obtenidas de estudios con ratones singénicos. Brevemente, cuando diferentes cepas fueron expuestas en forma aguda a bajas dosis de radiación UVB, y después retadas con un hapteno sobre la piel expuesta, algunas cepas fueron incapaces de desarrollar hipersensibilidad por contacto, desarrollando tolerancia hapteno-específica, en tanto que en otras cepas sí presentaron la reacción. (Toews *et al.*, 1980; Streilein *et al.*, 1988). Posteriormente, un estudio realizado en humanos sometidos a un protocolo agudo de radiación con dosis bajas de UVB y una dosis sensibilizante del hapteno Dinitroclorobenceno (DNCB), mostró que el 100% de los individuos que recibieron DNCB sobre la piel normal (no irradiada), desarrollaron hipersensibilidad por contacto cuando se desafiaron con el hapteno 30 días después, mientras que sólo el 65% de los individuos que fueron irradiados fueron capaces de presentar esta respuesta (Yoshikawa *et al.*, 1990). Aplicando este mismo protocolo a sujetos de piel muy pigmentada, se encontró también que el 60 % de los sujetos con piel oscura desarrollaron hipersensibilidad por contacto cuando se les aplicó DNCB en la piel previamente irradiada (Vermeer *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que,

independientemente del pigmento de la piel, los humanos parecen tener 2 fenotipos inmunológicos diferentes: 1) UVB-resistente – con respuesta de hipersensibilidad normal – (propuesto como fenotipo de baja susceptibilidad a cáncer de piel) y 2) UVB-sensible – con respuesta de hipersensibilidad baja o nula al reto – (propuesto como fenotipo de alta susceptibilidad a cáncer).

Un estudio que apoyó la existencia de dichos fenotipos fue realizado en dos tipos de individuos; 1) sanos y 2) individuos con historia de cáncer de piel de tipo no melanoma. La población en estudio se evaluó en relación al fenotipo de respuesta a la exposición a UVB + hapteno, y respuesta al reto con hapteno. Los resultados mostraron que el 60 % de los individuos sanos presentaron un fenotipo UVB resistente (bajo riesgo), mientras que el 92% de los individuos con cáncer de piel, presentó el fenotipo UVB-sensible (riesgo alto) (Yoshikawa *et al.*, 1990).

Para tratar de definir los posibles factores genéticos responsables del fenotipo UVB sensible, han sido realizado estudios en ratones congénicos para la región H-2 (en murinos corresponde a la región del complejo de histocompatibilidad), definiéndose que en este complejo (H-2) existen uno o más *loci* que gobiernan al fenotipo UVB-sensible (Streilein *et al.*, 1988; Kurimoto *et al.*, 1994, Vincek *et al.*, 1993).

En relación a esto, se sabe que la región H-2 contiene los genes de la familia *Tnf* y que existe una serie de alelos polimórficos en el *locus* del *Tnf α* . Se ha encontrado hasta un 100% de correlación entre el alelo *Tnf α ^d* y el fenotipo UVB-resistente. Debido a que este polimorfismo está dentro de las regiones regulatorias del gene *Tnf α* , se ha propuesto que la UVB, de manera directa o indirecta, promueve la activación de este

gene en las células cutáneas expuestas a UVB. De hecho, se ha encontrado que la exposición aguda a bajas dosis de UVB, impide la inducción de hipersensibilidad por contacto en ratones con predisposición genética (UVB-sensibles). La susceptibilidad a este efecto dañino de la UVB parece depender de los alelos polimórficos que regulan la producción de citocinas pro-inflamatorias, especialmente el TNF- α (Streilein, 1996).

Polimorfismo en genes de enzimas detoxificantes.

Diversos investigadores han sugerido que la toxicidad de algunos agentes químicos asociados con el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, está asociada con la ruta metabólica de detoxificación y la capacidad metabólica de los individuos expuestos.

En el caso particular del arsénico, se ha propuesto que si la capacidad de depuración es rápida, el individuo presentará menor riesgo de desarrollar efectos tóxicos dependientes del As_i (As inorgánico). Sin embargo, se ha hipotetizado que si se rebasa la capacidad de detoxificación, pueden ocurrir alteraciones que pueden estar asociadas con el desarrollo de cáncer. (Marcus *et al.*, 1988).

En humanos y diversos mamíferos, se ha demostrado que la metilación del As_i resulta en la formación de ácido monometilarsónico (MMA), y la de éste dá lugar a la formación de ácido dimetilarsínico (DMA) (Vahter, 1994). Este mecanismo ha sido considerado como un proceso detoxificante, debido a que los compuestos metilados son menos tóxicos (Yamauchi *et al.*, 1994), reaccionan menos con compuestos tisulares y se excretan más rápidamente por la orina en comparación con el As_i (Vahter, 1994; Vahter and Marafante, 1987).

La bio-metilación del arsénico no está caracterizada por completo, pero se acepta que en la mayoría de los mamíferos, el DMA es el producto final del metabolismo (Cullen *et al.*, 1984, Thompson, 1993). Desde 1945 se sabe que la metilación ocurre enzimáticamente por la adición oxidativa de grupos metilo al arsénico, con S-adenosil-metionina como el donador de grupos metilo (Challenger, 1945), y la reducción de As^{+5} a As^{+3} , un requisito para iniciar la metilación, parece llevarse a cabo con glutatión reducido (GSH) (Buchet *et al.*, 1985). Se ha sugerido que las metiltransferasas del DNA, son parcialmente responsables de la metilación del arsénico, pero no se descarta la existencia de otras metil-transferasas que lleven a cabo la mayor parte de la metilación, e incluso se sugiere que existe polimorfismo en los genes de las enzimas metilantes. Las evidencias de que existen diferencias interindividuales en la capacidad de metilación del As (Del Razo *et al.*, 1997), apoya la propuesta del polimorfismo en los genes de dichas enzimas, aún cuando no ha sido demostrado. Esto podría explicar parcialmente, el hecho de que en poblaciones expuestas a niveles similares de As y por tiempos equivalentes, se desarrollan lesiones cancerosas de piel sólo en algunos individuos, en tanto que la mayoría no presentan lesiones aparentes, lo cual es un indicio de que existen diferencias en la susceptibilidad individual al efecto tóxico de este metaloide.

Polimorfismo de HLA y cáncer de piel.

A partir del análisis de los antígenos HLA de pacientes inmunosuprimidos con fines de transplante renal, se ha sugerido que algunos alelos parecen conferir un mayor riesgo de cáncer de piel de tipo no melanoma, mientras que otros han sido relacionados con protección (Bavinck *et al.*, 1990, 1991b).

Los estudios para evaluar el polimorfismo de HLA como factores de riesgo para cáncer de piel, son pocos y han sido realizados en poblaciones de diferentes continentes y orígenes étnicos, por lo que los resultados son controvertidos, aunque de gran interés por tratarse de la región más polimórfica conocida del genoma humano y porque los productos codificados por esta región, juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune.

Los estudios hasta ahora realizados, han identificado alelos HLA que se han asociado con riesgo y con protección en diversas poblaciones (Bavinck *et al.*, 1997, Boyle *et al.*, 1984, Barr *et al.*, 1989, Hartevelt *et al.*, 1990, Bavinck *et al.*, 1991b). Este tipo de resultados han sido atribuidos al menos parcialmente a las variaciones étnicas en las frecuencias de alelos HLA, así como a la heterogeneidad de otros factores genéticos y ambientales como las infecciones virales y bacterianas, dieta, etc. que también confieren riesgo para el desarrollo de cáncer de piel. (Lulli *et al.*, 1998).

El *loci* de HLA I clase, en especial los alelos HLA-A3 y HLA-A11 se han asociado con cáncer de piel, a partir de estudios en poblaciones de diferente origen étnico (Bavinck *et al.*, 1994). En la tabla III se muestran de manera resumida los datos obtenidos para ellos.

Por otro lado, estudios realizados en pacientes holandeses inmunosuprimidos para trasplante de órganos, también han mostrado asociaciones positivas de otro alelo, el HLA-B27, con cáncer de piel en general con un riesgo relativo ¹ (RR) de 3.5 (p=0.001) (Bavinck *et al.*, 1990), y para cáncer de células escamosas de piel (RR= 3.8 y p=0.001) (Bavinck *et al.*, 1991a). En población australiana también se ha encontrado esta

asociación con carcinoma de células escamosas (RR=4.8 y p=0.003 (Czarnecki *et al.*, 1992b, Czarnecki *et al.*, 1992c).

Tabla III. Estudios en humanos en que muestran resultados controvertidos de los alelos HLA-A3, HLA-A11 y HLA-DQ3, con cáncer de piel.

Tipo de Cáncer	Molécula HLA	Asociación reportada	RR ^a	Tipo de población	Población estudiada	Tamaño de muestra ^b	p	Referencia
NM	HLA-A3	Ninguna	1.5	IS	Holandesa	66/505	0.14	Bavinck <i>et al.</i> , 1991a
NM	HLA-A3	Riesgo	2.1	IS	Holandesa	66/126	0.02*	Bavinck <i>et al.</i> , 1991a
NM	HLA-A11	Protección	0.11	IS	Holandesa	66/505	.003*	Bavinck <i>et al.</i> , 1990, 1991
CE	HLA-A11	Protección	0.15	IS	Holandesa	49/505	0.01*	Bavinck <i>et al.</i> , 1990, 1991
NM	HLA-A11	Ninguna	0.70	IS	Australianos (parte sur)	30/201	0.58	Czarnecki <i>et al.</i> , 1992
NM	HLA-A11	Riesgo	1.7	IS	Australianos (Queensland)	271/827	0.009*	Bavinck <i>et al.</i> , 1997
NM	HLA-A11	Ninguna	0.68	IS	Inglesa	29/292	0.54	Mc Gregor <i>et al.</i> , 1992
NM	HLA-A11	Ninguna	0.7	IS	Inglesa	46/46	0.54	Glover <i>et al.</i> , 1993
M	HLA-DQ3	Protección	NR	N-IS	Italianos	53/53	0.018	Lulli <i>et al.</i> , 1998
M	HLA-DQ3	Riesgo	NR	N-IS	Caucásica (E.E.U.U.)	45/200	0.003	Lee <i>et al.</i> , 1994

^a RR= riesgo relativo ^b Cáncer/ No cáncer

N-IS= Casos No-InmunoSuprimidos; IS= InmunoSuprimida con fines de trasplante;

M= Melanoma; NM=no melanoma;

CE=Carcinoma Epidermoide

¹**Riesgo relativo o razón de momios.** Para medir el nivel de asociación entre una enfermedad y una característica dada, se utiliza el término riesgo relativo (RR), sin embargo cuando el valor se obtiene de un estudio de casos y controles, el término correcto es el de razón de momios (OR por sus siglas en inglés -odds ratio-). Ambos términos reflejan la frecuencia de la enfermedad en los individuos que tienen la característica analizada, comparado con la frecuencia de la enfermedad en los individuos que no presentan esa característica. De manera general, un riesgo relativo o razón de momios mayor a 1 indica asociación entre la enfermedad y la característica y mientras más grande es el valor, mayor es la asociación (Hansen *et al.*, 1993). El RR se calcula como sigue:

$$RR = \frac{\text{Característica}^+ / \text{característica}^- \text{ en los pacientes con la enfermedad}}{\text{Característica}^+ / \text{característica}^- \text{ en los individuos control}}$$

En una tabla de dos por dos, se representan estos mismos datos de la siguiente manera:

	Característica ⁺	Característica ⁻	RR= AD/BC
Enfermedad	A	B	
No enfermedad	C	D	

Algunos estudios también han mostrado la existencia de asociaciones con algunos alelos de HLA clase II con cáncer de piel. Entre este tipo de moléculas HLA se encuentra HLA-DQ3, también con resultados controvertidos (ver Tabla III). Esta molécula se ha asociado en italianos con protección (Lulli *et al.*, 1998), pero en población caucásica Americana, lo han hecho con riesgo (Lee *et al.*, 1994), para melanoma. Otros reportes indican que no se encuentra ninguna asociación (Marincola *et al.*, 1992, Muto *et al.*, 1996).

Por otro lado, estudios con pacientes australianos inmunosuprimidos han mostrado que el alelo HLA-DR7 se asocia (RR= 2.6 y p= 0.02), a carcinoma de células escamosas (Czarnecki *et al.*, 1992b y 1992c), mientras que en pacientes holandeses los datos obtenidos por Bavinck y col. en 1990, no mostraron asociación significativa ni con cáncer de piel en general (RR= 1.4 y p= 0.35), ni con carcinoma de células escamosas (RR= 1.1 y p= 0.76) (Bavinck *et al.*, 1990), pero encuentran una fuerte asociación con cáncer de piel de tipo no melanoma en pacientes inmunosuprimidos y positivos (IgM) a papiloma virus humano tipo 8 (RR= 26.2 y p= 0.0002) (Bavinck *et al.*, 1993).

Otros estudios han mostrado asociación de HLA-DR1 con cáncer de piel no melanoma. En población abierta en Italia, se asoció con riesgo para cáncer de piel (no melanoma) en general (RR= 2.9 y p= 0.002), con carcinoma de células basales (RR= 3.0 y p= 0.006) (Ceremile *et al.*, 1988); en población australiana, con carcinoma múltiple de células basales (RR= 2.1 y p= 0.01) (Czarnecki *et al.*, 1991b y Czarnecki *et al.*, 1992a); y en población del Reino Unido como factor de riesgo (RR= 2.2 y p = 0.07) para cáncer de piel no melanoma en general (Glover *et al.*, 1993).

En Australia, se ha reportado una asociación negativa de HLA-DR4 con carcinoma múltiple de células basales, (RR= 0.52 y p= 0.04) (Czarnecki *et al.*, 1991b, Czarnecki *et al.*, 1992a) mientras que en italianos no se encontró asociación (RR= 0.69 y p= 0.34) ni con cáncer de piel en general, ni con carcinoma múltiple de células basales (RR= 0.70 y p = 0.42) (Ceremile *et al.*, 1988).

Otros estudios realizados con poblaciones también con cáncer de tipo no melanoma, pero con diferentes grados de alteraciones en la inmunidad celular (no inducida con fines terapéuticos) han mostrado asociaciones con algunos alelos HLA como: Cw3, DR1, DR7, DR4 y DR53 asociadas con riesgo (Myskowski *et al.*, 1985, Czarnecki *et al.*, 1991b, Ceremile *et al.*, 1988, Czarnecki *et al.*, 1992c, Czarnecki *et al.*, 1991a, Czarnecki *et al.*, 1993, Czarnecki *et al.*, 1994), y los alelos B17(B58) y DR3 con protección.

Finalmente, otros estudios no relacionados con cáncer de piel, han demostrado que también la homocigocidad en las moléculas HLA-DR representa un factor de riesgo para el desarrollo de algunos tipos de cáncer como enfermedad de Hodgkin y leucemia aguda (Dausset *et al.*, 1982, von Flidner *et al.*, 1980). Con base en lo anterior se ha propuesto que esto puede ocurrir debido a que se reduce el número de productos polimórficos Clase I y II, y como resultado de esto se disminuyen las posibilidades de interacción con péptidos antigénicos y hay menor reconocimiento de antígenos extraños.

III. JUSTIFICACION

Actualmente existe un esfuerzo internacional dirigido a evaluar los aspectos epidemiológicos y los mecanismos involucrados en el desarrollo del cáncer de piel. Por ello se ha recomendado la identificación y evaluación de nuevos marcadores biológicos de susceptibilidad para definir los factores de riesgo que permitan entender la variabilidad interindividual para desarrollar patologías, particularmente del tipo de las neoplasias asociadas a la exposición a xenobióticos.

Los factores de susceptibilidad que se han sugerido para cáncer de piel incluyen la existencia de polimorfismo en los genes involucrados en la pigmentación de la piel, además de la existencia de un genotipo sensible a la radiación ultravioleta (Toews *et al.*, 1980, Streilein *et al.*, 1988, Yoshikawa *et al.*, 1990, Vermeer *et al.*, 1991).

Por otro lado, la American Society of Cancer (ASC, 1998) ha definido los siguientes factores de riesgo para cáncer de piel: 1) Una exposición excesiva a radiación ultravioleta, 2) Color de piel blanca, 3) Género masculino, 4) Exposición a algunos químicos, entre los cuales está incluido de manera preponderante el arsénico como un riesgo bien identificado de desarrollar cáncer de piel de tipo no melanoma, 5) Exposición a radiaciones como tratamiento para otros tipos de cáncer, 6) Inflamación prolongada o severa de la piel, 7) Tratamiento de psoriasis y 8) Inmunidad reducida.

En este sentido, a partir de los estudios realizados en pacientes con cáncer de piel, tratados con inmunosupresores, se ha definido que además de factores desencadenantes, como los que ya se han identificado para la aparición de cáncer, existen otros factores no bien establecidos pero que se sugieren están asociados con su desarrollo, como la

presencia de algunos alelos del Complejo Principal de Histocompatibilidad, además de un estado de permisividad inmune.

Existen estudios realizados en poblaciones inmunosuprimidas por trasplante renal, en las que se han asociado como factores de susceptibilidad genética algunos alelos de HLA. Algunos estudios han asociado el alelo HLA-A como factor de riesgo) o de protección (Bavinck *et al.*, 1994). En otros se han asociado otros alelos, como HLA-B27 y HLA-DR7, como factores de riesgo en poblaciones Holandesa y Australiana (Bavinck *et al.*, 1994).

Por otro lado, a partir de estudios relacionados con la capacidad inmunotóxica del arsénico en modelos animales (Sikorski 1991a y b) y en humanos (Ostrosky-Wegman *et al.* 1991, Gonsebatt *et al.* 1992 y 1994), se ha sugerido que durante la exposición crónica a arsénico se induce un estado de permisividad inmune. Este estado de permisividad inmune puede favorecer la asociación de otros factores relacionados con el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, como la infección con virus oncogénicos. Estas dos condiciones, en los individuos que cuenten con un marco genético que confiera susceptibilidad para cáncer y expuestos al arsénico, pueden modificar el riesgo para el desarrollo de cáncer.

De hecho, las evidencias acumuladas hasta la fecha indican que en los procesos cancerosos, los mecanismos de transformación maligna dependen de diversos factores entre los cuales las características genéticas tienen un papel importante, sin embargo, el cáncer no se expresa a menos que existan otros factores desencadenantes, en los cuales los ambientales tienen un papel relevante (Harnden, 1990). En otros términos, ante la existencia de factores de susceptibilidad genética, la suma de diversos factores de riesgo como son la presencia de agentes infecciosos y ambientales, aumenta el riesgo total para el desarrollo de una patología en particular .

A partir de estos datos, en el presente proyecto proponemos estudiar la frecuencia de los alelos HLA-DR7, HLA-B27, y HLA-A11 en una población de nuestro país y evaluar la asociación de éstos como factores de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma.

En México se conoce que la exposición crónica a altas concentraciones de As en el agua de bebida representa un problema en estados como Chihuahua, Morelos, Guanajuato, Michoacán, San Luis Potosí e Hidalgo y la Región Lagunera de Coahuila y Durango. De estos, la Región Lagunera es donde el arsenicismo ha sido mejor estudiado y documentado, estimándose que la prevalencia de lesiones dérmicas por arsenicismo es de 200 - 400 /1000 habitantes (USEPA, 1988) y la de cáncer de piel no melanoma es de 14/1000 habitantes (Cebrian *et al.*, 1983), por lo cual decidimos realizar el estudio en dicha Región, lo que nos permitiría el acceso a pacientes con cáncer de piel de tipo no melanoma, no asociada así como asociada a historia de exposición crónica a arsénico.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la asociación del desarrollo de cáncer de tipo no melanoma, con la presencia de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7, en individuos con y sin historia de exposición a arsénico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estandarizar las metodologías y condiciones experimentales que permitan la manipulación de muestras biológicas obtenidas en el trabajo de campo.
- 2.- Evaluar si en el repertorio de HLA de los individuos incluidos en el estudio, existen los alelos HLA-B27 y HLA-DR7 asociado con mayor susceptibilidad, y el alelo HLA-A11, asociado con menor susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma.
- 3.- Estudiar las asociaciones que éstos alelos tienen con la presencia o ausencia de lesiones cancerosas de tipo no melanoma en la población estudiada.
- 4.- Evaluar la utilidad de estos alelos, como indicadores de susceptibilidad genética para el desarrollo de cáncer de piel, de tipo no melanoma, en individuos expuestos y no expuestos crónicamente a arsénico.

V. METODOLOGIA

1.- DISEÑO DEL ESTUDIO.

Para el trabajo se diseñó un estudio de casos y controles hospitalario. La muestra se constituyó por pacientes que acudieron, a lo largo de un año, a la consulta de Dermatología en el Hospital de Especialidades número 71 del IMSS en la ciudad de Torreón, Coahuila y que aceptaron participar en el estudio, en respuesta a la invitación que hicieron los médicos dermatólogos a los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de definición para cada grupo.

CASO: Individuo que asistió a la consulta dermatológica, que tuvo diagnóstico clínico de cáncer de piel, y que cumplió con los criterios de inclusión.

CONTROL: Individuo que asistió a la consulta dermatológica, por un diagnóstico diferente a cáncer de piel, sin antecedentes de haberlo padecido y que cumplió con los criterios de inclusión. Que la asistencia a la consulta dermatológica no fuera por motivos cosméticos.

Criterios de inclusión.

- 1) Edad entre 16 – 85 años.
- 2) Que se contara con el consentimiento informado, por escrito.
- 3) Que cumpliera con los criterios de definición especificados para cada grupo.

Criterios de exclusión.

- 1) Ingestión de alimentos marinos 5 días previos a la donación de la muestra de orina.
- 2) Antecedentes de inmunosupresión primaria, o secundaria al uso de quimioterapia y/o radioterapia.

Variables:

DEPENDIENTE.- La variable dependiente en este estudio fue la presencia o ausencia de cáncer de piel de tipo no melanoma.

INDEPENDIENTES.- Se consideraron como variables independientes:

- 1) la presencia de los alelos HLA, y
- 2) la exposición a arsénico. Esta se evaluó de dos maneras: exposición actual y exposición histórica (estimada a partir de la historia de residencia de toda la vida de cada paciente).

COVARIABLES.- Además de las variables mencionadas anteriormente, se consideraron para la evaluación las siguientes covariables: 1) edad, 2) género 3) nivel socioeconómico y ocupación, 4) trabajo en lugares abiertos o cerrados, 5) exposición a luz solar, 6) exposición a otros tóxicos como solventes, insecticidas, plaguicidas, 7) alimentación, 8) consumo de tabaco y 9) consumo de alcohol.

Es importante señalar que en este estudio no se tuvo control sobre las exposiciones analizadas y que cada una de las variables se definieron de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1) La definición de casos y controles se realizó de acuerdo al diagnóstico clínico elaborado por los médicos especialistas.
- 2) Para determinar la presencia de los alelos HLA de interés se utilizaron métodos moleculares como se indica en la sección correspondiente.
- 3) Para determinar la exposición actual a arsénico se utilizó como indicador la presencia del arsénico total en orina, determinado por espectrofotometría de absorción atómico (detallado en la sección de métodos), debido a que este es el indicador de exposición más aceptado (ATSDR,1989).
- 4) La información general de cada paciente, así como la necesaria para estimar la historia de exposición a arsénico (a través de la historia de residencia y fuentes de abastecimiento de agua), la exposición pasada y actual a luz solar, tabaquismo, consumo de alcohol, condición socioeconómica (incluyendo nivel de escolaridad, nivel económico, alimentación), se obtuvo a través de un cuestionario.

2.- METODOS

Obtención de muestras biológicas.

ORINA: La muestra colectada de los individuos participantes en el estudio correspondió a la primera orina del día y se colectó en un recipiente nuevo de polipropileno, estéril y previamente identificado. Las muestras se conservaron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

AGUA: La muestra de agua proveniente del domicilio de cada paciente (agua de bebida habitual), se colectó en recipientes de polipropileno, lavados previamente con ácido nítrico diluido y perfectamente secos. Para la obtención de la muestra se le pidió al

individuo que dejara correr el agua del grifo durante 15-20 segundos antes de tomar la muestra. Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

SANGRE.- De la vena braquial de cada individuo se obtuvo una muestra de 28 ml de sangre, colectados en tubos Vacutainer de 7 ml/EDTA. Esta se mantuvo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento para la obtención de DNA.

Purificación de células con Ficoll-Hypaque.

Las células mononucleadas de la sangre se separaron de acuerdo al método de Klaus (Klaus, 1987), el cual brevemente consiste en lo siguiente. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Se colectó el plasma y se congeló, mientras que la capa de células blancas de la superficie del paquete celular se transfirió a un tubo de 15 ml y se resuspendió en 5 ml de PBS estéril (Buffer de fosfato de potasio 0.015 M + NaCl 0.15 M). La suspensión celular se transfirió, a otro tubo de 15 ml, depositándola sobre 3 ml de solución separadora de linfocitos Ficoll-Hypaque (Nycomed, Pharma AS, Oslo, Norway), previamente llevada a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos, con la centrifuga sin freno. Se colectó la interfase (que correspondió a las células mononucleares), descartando previamente el sobrenadante sin perturbar la interfase. La suspensión de células mononucleadas, se lavó con un volumen igual de PBS estéril y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y recuperando la pastilla celular.

Purificación de células por lisis con MgCl_2 .

Se centrifugaron los tubos Vacutainer a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Se colectó el plasma en un tubo de 15 ml el cual fue congelado, cuidando de no perturbar la

fracción superior del paquete celular que corresponde a las células blancas. Al paquete celular completo se le agregaron 3 ml de una solución de $MgCl_2$ 5 mM; los tubos se taparon y se agitaron por inversión. Se colectó el contenido de los tubos Vacutainer de cada paciente y se transfirieron a un tubo de 50 ml, ajustando el volumen a 50 ml con la misma solución y agitando suavemente, durante 15 minutos para lisar los eritrocitos. El contenido se centrifugó a 3000 rpm a 4°C. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante. El procedimiento se repitió en dos ocasiones para completar la lisis de los eritrocitos. Después de la segunda centrifugación, a la pastilla de células blancas se les agregó una solución de $MgCl_2$ 5 mM + Nonidet P40 0.1 %, ajustando nuevamente el volumen a 50 ml. El tubo se agitó y se centrifugó a 3000 rpm a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se obtuvo el paquete de células (Gorodezky, 1996).

Digestión con proteinasa K.

La pastilla celular de las células mononucleares o las células blancas obtenidas como se indicó antes, se suspendió en 1 ml de PBS estéril y se le agregó 1 ml de buffer de lisis de células blancas (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6+EDTA 10mM+ NaCl 50mM+SDS 0.2%) conteniendo proteinasa K (300 μ g/ml), ajustado por cada tubo Vacutainer procesado (\approx 7.0 ml de sangre / tubo). Se dejó incubar toda la noche a 53°C en baño María.

Extracción con Fenol-Cloroformo.

Al producto de la digestión con proteinasa K se le añadió un volumen equivalente de fenol saturado. Se agitó 10 minutos manualmente hasta formar una emulsión. Se

centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se tomó la fase superior y se transfirió a un tubo limpio y se repitió la extracción con fenol saturado. Después de ésta se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo v/v, centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase superior a un tubo limpio y se hizo una última extracción con cloroformo - alcohol isoamílico (24:1) v/v. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio (Gorodezky, 1996).

Precipitación con isopropanol absoluto.

Al sobrenadante obtenido de la extracción con cloroformo - alcohol isoamílico, se añadió NaCl 5M para obtener una concentración final de 100 mM y se agregó un volumen de isopropanol absoluto. Se agitó suavemente por inversión hasta que se formó la hebra de DNA, la cual se colectó con una punta de plástico y se depositó en un tubo eppendorf de 1 ml que contenía 500 µl de etanol al 70%. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante, repitiendo el procedimiento de lavado con etanol una vez más. Se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el remanente de etanol. Finalmente el DNA se resuspendió en TE (Tris-HCl pH=8.0 10 mM-EDTA 1 mM) y se mantuvo a 4° C hasta su utilización.

Cuantificación y pureza del DNA obtenido.

Para cuantificar la cantidad de DNA se leyó cada muestra a 260 nm en un espectrofotómetro (Molecular Device, Mod. Spectra MAX 250, Sunnyvale, CA). El producto del valor de la densidad óptica corregida con un factor de 50, corresponde a la concentración expresada en µg/ml. Con el objeto de determinar contaminación por

fenol y/o proteínas, se determinaron las absorbancias de las muestras a 240 nm y 280 nm. Si la relación de los valores de las lecturas 260/280 y 260/240 fue entre 1.7 y 2.0, se consideraron libres de contaminación por proteínas y por fenol, respectivamente.

Verificación de la integridad del DNA.

Se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, pre-teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml de gel).

Optimización de extracción de DNA en las condiciones del trabajo de campo.

Debido a que las muestras de los pacientes se tomaron en la Cd. de Torreón fue necesario establecer las condiciones para obtener DNA de óptima calidad. Para esto se probaron 8 protocolos diferentes, involucrando diferentes métodos de purificación de leucocitos, congelación de células y extracción directa de DNA el mismo día de la obtención de la muestra de sangre. El diagrama de flujo de los procedimientos probados se muestra en la Figura 1.

Determinación de la presencia de los alelos HLA-DR7, HLA-B27 Y HLA-A11.

Los tres alelos se detectaron por técnicas moleculares, específicamente por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-SSP) utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia de cada alelo. Se consideró positivo la presencia de cada alelo en las muestras si se obtenía la banda de amplificación del tamaño esperado. La ausencia o presencia de cada alelo fue detectada con 10 µl del producto amplificado,

mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% preteñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gel).

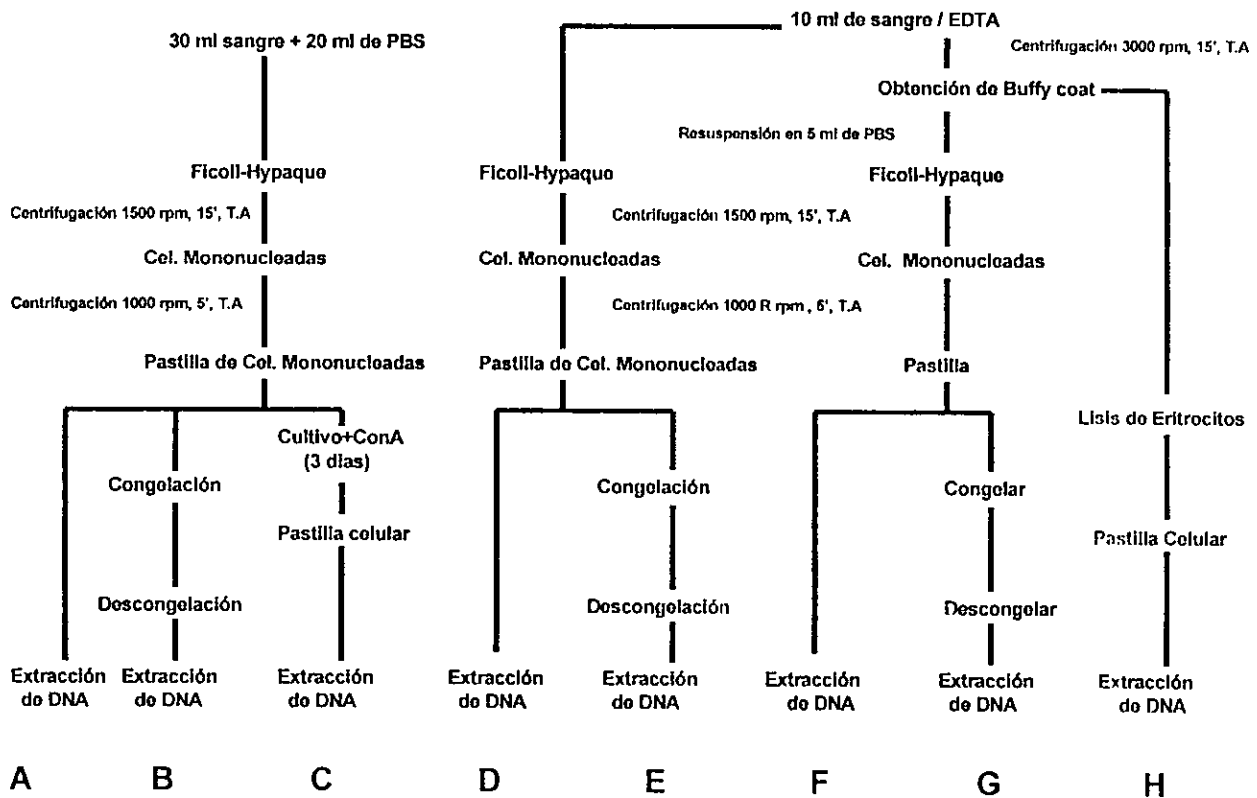


Figura 2.- Diagrama de flujo de los protocolos probados para la extracción de DNA. El protocolo escogido fue el F, por su rapidez, economía y rendimiento de DNA. Los pasos esencialmente se encuentran descritos en Métodos. En el tratamiento C, las células fueron resuspendidas en Medio Completo (RPMI suplementado) y se estimuló con ConA (1 microgramo/ml), manteniéndose en incubación durante 3 días, a 37 °C, y 5 % de CO₂.

En todos los casos se contó además con controles de DNA positivos y negativos provenientes de un laboratorio de referencia. Como control interno se utilizó además, la amplificación de una región del gene β -2 microglobulina, como se indicará al final de esta sección.

DetECCIÓN DEL ALELO HLA-DR7.

Se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, con el uso de iniciadores (que corresponden a la región hipervariable del exón 2 específicos de secuencia (PCR-SSP), llamados 3'07 y 5'079 (Zetterquist *et al.*, 1992), cuyas secuencias son las siguientes:

5'-CCC-GTA-GTT-GTG-TCT-GCA-CAC 3'07
5'-CCT-GTG-GCA-GGG-TAA-GTA-TA 5'079

El fragmento amplificado esperado correspondió a un producto de 232 pares de bases.

El programa de amplificación utilizado fue:

Desnaturalización inicial	95°C	por	5 min.
Alineación	63.5°C	por	50 seg
Extensión	72°C	por	50 seg
Durante 34 ciclos			
Extensión final	72°C	por	5 min

DetECCIÓN DEL ALELO HLA-B27.

Se realizó mediante la técnica PCR-SSP, con iniciadores específicos de secuencia en el exón 3, llamados E91s y E136as (Dominguez *et al.*, 1992), cuyas secuencias son las siguientes:

5'-GGG-TCT-CAC-ACC-CTC-CAG-ATT E91s
5'-CGG-CGG-TCC-AGG-AGC-T E136as

El fragmento amplificado esperado correspondió a un producto de 135 pares de bases.

El programa de amplificación utilizado fue:

Desnaturalización inicial	95°C	por	5 min.
Alineación	65°C	por	45 seg
Extensión	72°C	por	45 seg
Durante 30 ciclos			
Extensión final	72°C	por	5 min

Detección del alelo HLA-A11.

Se realizó mediante la técnica de PCR-SSP usando iniciadores específicos de secuencia, llamados AL-6 (específico del exón 2) y AL-I, (que define motivos en el exón 3) (Krausa *et al.*, 1996 y 1993), cuyas secuencias son las siguientes:

5'-CGG-AAT-GTG-AAG-GCC-CAG	AL-6
5'-TCT-CTG-CTG-CTC-CGC-CG	AL-I

El fragmento amplificado esperado correspondió a un producto de 518 pares de bases.

El programa de amplificación utilizado fue:

Desnaturalización inicial	95°C	por	5 min.
Alineación	65°C	por	1 min
Extensión	72°C	por	2 min
Durante 30 ciclos			
Extensión final	72°C	por	5 min

Detección del gene β -2 microglobulina.

Se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, con iniciadores específicos del gen, llamados B2M-1 y B2M-2 (Krausa *et al.*, 1996) cuyas secuencias son las siguientes:

5'-CGA-TAT-TCC-TCA-GGT-ACT B2M-1

5'-CAA-CTT-TCA-GCA-GCT-TAC B2M-2

El fragmento amplificado esperado correspondió a un producto de 340 pares de bases.

El programa de amplificación utilizado fue:

Desnaturalización inicial	95°C	por	5 min.
Alineación	55°C	por	50 seg
Extensión	72°C	por	50 seg
Durante 25 ciclos			
Extensión final	72°C	por	5 min

Determinación de la concentración de arsénico en agua y orina.

Las muestras se digirieron de acuerdo al método descrito por Cox (Cox, 1980).

La técnica se basa en la ruptura de los enlaces carbono - arsénico presentes en las muestras, bajo condiciones ácidas y altas temperaturas, para obtener finalmente arsénico inorgánico. Después de la digestión, el As^{+5} se reduce a As^{+3} utilizando como reductor yoduro de potasio, adicionando borohidruro de sodio para formar el gas arsina que después es arrastrado por una corriente de nitrógeno a una celda de cuarzo calentada con una flama de aire - acetileno, en la cual se lleva a cabo la atomización de la muestra.

Brevemente, la preparación de las muestras fue la siguiente. Las muestras tanto de orina como de agua, previamente homogeneizadas, se colocaron en vasos de 100 ml, se les adicionó 6 ml de HNO_3 : HClO_4 (5:1), se cubrieron con vidrios de reloj, se mantuvieron durante 1 hora a 100°C , se enfriaron a temperatura ambiente. Se les agregó 2.5 ml de HNO_3 concentrado y mantuvieron a 200°C hasta que quedó un volumen de aproximadamente 1 ml. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionó 2 ml de H_2SO_4 , manteniendo durante 2 horas a 250°C . La digestión terminó cuando las muestras se tornaron incoloras. Se reconstituyeron en 10 ml de HCl al 10%, adicionando 1 ml de KI al 20% y reposando 30 minutos para permitir la reducción del As^{+5} presente en la muestra.

Cada muestra fue preparada por duplicado y la concentración de As se determinó por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros, en un equipo Perkin Elmer Modelo 3100, preparándose para cada serie de trabajo una curva de calibración con los estándares adecuados. Todo el procedimiento se realizó con el apoyo del laboratorio de metales de la Sección de Toxicología Ambiental.

Evaluación retrospectiva de la exposición a arsénico.

Para estimar la historia de exposición a arsénico, se utilizó la historia de residencia a lo largo de toda la vida de cada sujeto incluido en el estudio y se asignaron las concentraciones de arsénico definida para cada localidad, de acuerdo a datos documentados previamente en la Sección de Toxicología Ambiental, del Depto. de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV-IPN, y por la Gerencia Regional de las Cuencas Centrales del Norte de la Comisión Nacional del Agua.

Cuando no se encontró documentada la concentración de los niveles de arsénico en una localidad de residencia, se tomó el dato de la localidad más cercana, utilizando para su ubicación mapas de la región.

Con los datos obtenidos se calculó la exposición acumulada (EA) a arsénico a través de los años de acuerdo al método reportado en 1995 por Hsueh y col. (Hsueh *et al.*, 1995), de acuerdo a lo siguiente:

$$EA = \frac{\sum ([As] \times \text{años})^a}{\sum \text{de exposición}^b}$$

Donde: ^a es la sumatoria de multiplicar la [As] promedio por el tiempo de consumo (años) en cada comunidad, y ^b es la sumatoria de los años en exposición.

La [As], obtenida en ppb, se estratificó de acuerdo a este mismo autor (Hsueh *et al.*, 1995) en tres niveles históricos de exposición a arsénico, como sigue:

	Baja	Media	Alta
[As]	0-5.0	5.1 - 25.0	25.1-∞

Análisis de resultados.

Todos los datos se analizaron por métodos estadísticos para evaluar diferencias entre casos y controles, aplicándose análisis de regresión logística y análisis de regresión multivariada. Para ello se utilizaron los programas Fox Pro 2.6 y Stata 5.0 para análisis estadístico. Se estableció como diferencia significativa una $p \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS

Optimización de las condiciones de campo.

De las 8 condiciones evaluadas para la obtención de DNA genómico, el protocolo seleccionado, fue el F, indicado en la Figura 2. La elección se tomó con base a que al realizar los procedimientos en las condiciones de trabajo de campo (no en el laboratorio de investigación) el mayor rendimiento de DNA obtenido fue con ese protocolo (Tabla IV). Alternativamente, el protocolo H (lisis con $MgCl_2$) fue usado cuando las muestras de sangre llegaron al sitio donde se procesaban, después de 5 h de haberse obtenido.

TABLA IV. Rendimiento obtenido de DNA con los protocolos evaluados^a.

A	B	C	D	E	F	G	H
0.164µg	0.036 µg	No Proliferaron	0.170 µg	No se obtuvo DNA	0.169 µg	0.123µg	0.099µg

^a Referirse a Figura 2, de Metodología.

Las letras en la línea superior de la tabla corresponden a los protocolos de extracción que se muestran en la Figura 2.

Características generales de la muestra.

Para el presente estudio se logró una $n = 84$ individuos. La distribución en porcentaje de acuerdo a casos y controles se presenta en la Figura 3, en donde como puede observarse 48 % ($n=40$) del total correspondió a individuos casos en tanto que 52% ($n=44$) fueron controles.

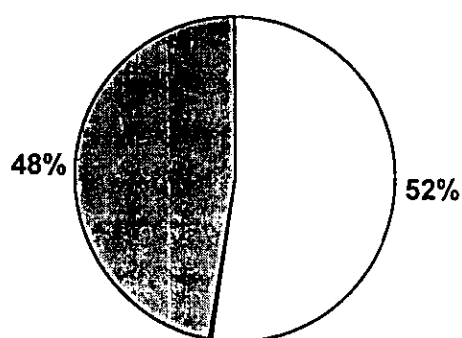


Figura 3.- Distribución de la muestra de acuerdo a casos y controles. La porción gris de la gráfica corresponde a los casos y la vacía a los controles. Los casos y controles fueron obtenidos de la consulta de Dermatología del Hospital de Especialidades del IMSS de la Cd. de Torreón, y la definición de éstos se realizó de acuerdo al diagnóstico clínico emitido por los médicos especialistas.

En la Tabla V se presenta la distribución de los casos de acuerdo al diagnóstico, y en la Tabla VI se presenta la distribución de los controles, también por diagnóstico. Es pertinente mencionar que en el carcinoma de células epidermoides se incluyeron los individuos con diagnóstico de enfermedad de Bowen, que corresponde a un carcinoma *in situ* de células escamosas, y a las hiperqueratosis arsenicales, consideradas como lesiones premalignas de carcinoma de células epidermoides (Orkin *et al.*, 1994).

TABLA V. Distribución de los casos de acuerdo al diagnóstico clínico.

Diagnóstico	<u>No. de Casos</u>	<u>Porcentaje</u>
Carcinoma Basocelular	19	47
Cáncer Epidermoide	17	43
Ambos tipos de Cáncer	2	5
Cáncer No Definido	2	5
Total	40	100

Los diagnósticos clínicos fueron determinados por médicos dermatólogos especialistas del Hospital de Especialidades del IMSS de la ciudad de Torreón, Coah.

TABLA VI. Distribución de los controles de acuerdo al diagnóstico clínico

Diagnóstico	No. de Controles	Porcentaje
Fibromas Laxos	4	9
Nevos	4	9
Queratosis Seborréicas	5	11
Xerosis, , Psoriasis, Dermatitis atópica, Liquen plano, Verruga vulgaris.	2 de c/u (total 10)	5 de c/u (total 25)
Efilides, Vitiligo, Alopecia areata, Herpes simple, Parasitodermia, Adenomas sebáceos, Melanosis Dermatomiositis, Eccema pigmentario, Actinodermatitis, Hipermelanosis guttata, Pitiriasis alba, Rosácea, Acné quístico, Melasma, Hiperpigmentaciones, Hiperhidrosis, Eritema	1 de c/u (18)	2 de c/u (36)
Diagnóstico sin definir	3	7
Total	44	100

Los diagnósticos clínicos fueron determinados por médicos dermatólogos especialistas del Hospital de Especialidades del IMSS de la ciudad de Torreón, Coah.

Distribución por género.

La distribución por género en los controles fue de 9 hombres y 35 mujeres, mientras que en los casos fue de 30 hombres y 10 mujeres. La distribución del total de la muestra se presenta en la Figura 4. El análisis bivariado de la muestra, de acuerdo a su distribución en casos y controles, mostró ser significativa (OR=11.66 con una $p=0.000$) para los varones. Esto es, de acuerdo a estos resultados, los varones tienen 10.66 veces mayor probabilidad de desarrollar cáncer de piel de tipo no melanoma, que las mujeres.

Distribución por edad.

El rango de edad de la población estudiada fue de 16-78 años. La distribución de los individuos caso y los controles de acuerdo a la edad se representa en la Figura 5. Como puede notarse en la gráfica, los casos se distribuyeron entre la quinta y

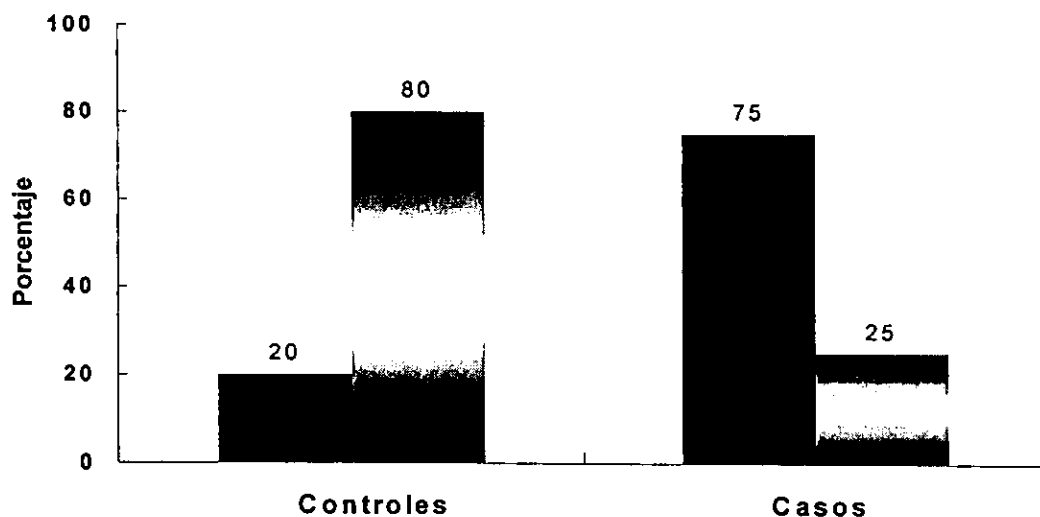


Figura 4.- Distribución por género en casos y controles. Las barras negras representan el porcentaje de varones en la muestra. Las barras grises representan el porcentaje de mujeres en el estudio. La información respecto al género fue obtenida a partir del cuestionario aplicado a cada paciente.

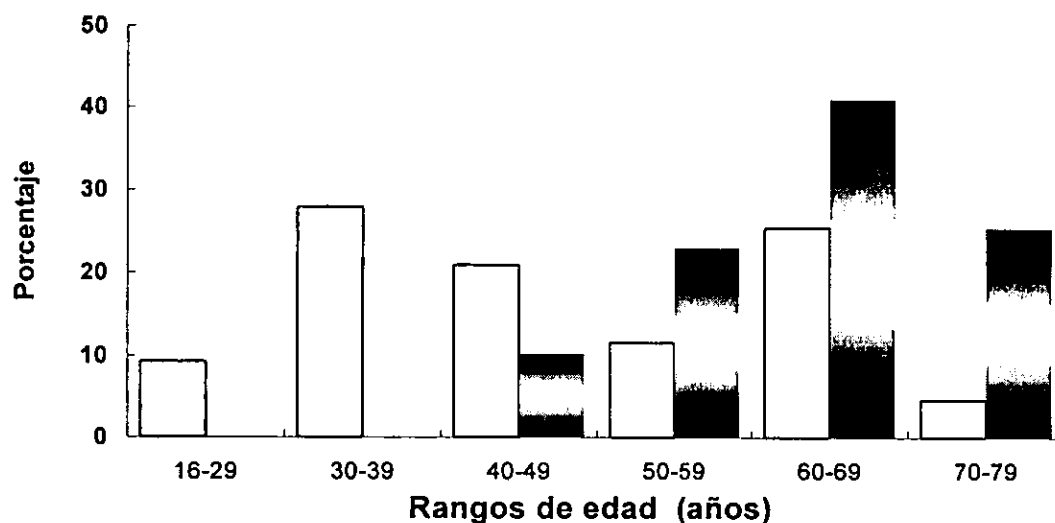


Figura 5.- Distribución por edad de casos y controles. Las barras vacías representan a los controles y las barras grises a los casos. La información relativa a la edad de cada paciente fue obtenida a partir de los datos del cuestionario. Los rangos de edad se consideraron de 10 años, excepto en el primer rango en donde se incluyó a un solo paciente menor de 20 años (16 años). La edad de los pacientes controles se distribuyó en todos los rangos de edad considerados. La edad de los casos se concentró a partir de la quinta y hasta la octava década de vida.

octava década de la vida en tanto que los controles se distribuyeron en todo el rango de edad de la muestra. La edad promedio en los controles fue de 47.7 años mientras que en los casos ésta fue significativamente mayor (promedio = 62.9 años) (ver Tabla VII). El análisis logístico bivariado de la población de acuerdo a la edad, mostró que la diferencia fue estadísticamente significativa (OR= 1.09 con una $p = 0.000$).

TABLA VII.- Rango de edad y edad promedio en el estudio.

	Rango de Edad	Edad Promedio	(n)
Casos	47-78	62.9	(n=39)
Controles	16-72	47.7	(n=43)

El análisis univariado se realizó con el programa STATA 5.0

El análisis logístico bivariado dio como resultado una OR= 1.09 ($p = 0.000$)

n = corresponde al número de pacientes incluidos para cada análisis.

Evaluación molecular de la presencia de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7.

Para definir la presencia de los alelos HLA de interés en la muestra, en primer lugar se evaluó para cada una de las muestras, la integridad del DNA. Para ello, se corrió una alicuota de 1 μg de DNA en geles de agarosa 1%. En la figura 6 se presentan los resultados representativos para varias muestras. Como puede observarse la calidad del DNA obtenido fue adecuada para continuar el proceso de determinación de los alelos.

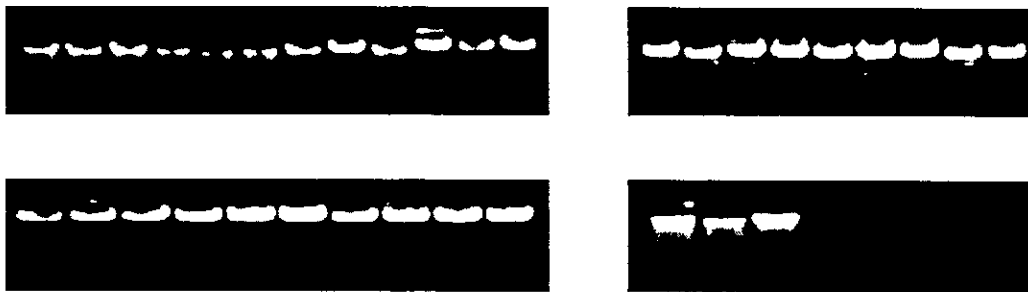


Figura 6 .- Integridad del DNA genómico extraído de los pacientes. Para cada muestra, se analizó la integridad de 1 μ g de DNA en un gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio.

Antes de evaluar la presencia de los tres alelos HLA de interés en la muestra, evaluamos la amplificación de una secuencia específica de un gene no polimórfico, el de β -2 microglobulina.

En la Figura 7, se muestran los resultados de la amplificación del DNA correspondiente a 30 muestras diferentes en donde se observa para todas ellas una banda correspondiente al producto de la amplificación específica, con el tamaño esperado. Para las 83 muestras evaluadas se obtuvieron resultados equivalentes a los mostrados en la Figura 7.

Cada muestra que resultó positiva en el análisis de integridad del DNA, se sometió a la amplificación por PCR, de la secuencia específica de los alelos HLA- A11, B27 y DR7, de acuerdo a lo indicado en métodos. El producto de la amplificación obtenido con los iniciadores alelo específicos, fue evaluado en geles de agarosa al 2 %. Para los tres alelos, la presencia del producto de amplificación del tamaño esperado, indicó que el paciente fue positivo para dicho alelo y la ausencia indicó que el paciente no presentaba en su genoma el alelo correspondiente. Para ilustrar los resultados obtenidos en la evaluación de la presencia de los alelos, en las Figuras 8-10 se presenta el análisis electroforético del producto de amplificación obtenido utilizando los iniciadores específicos de los alelos HLA-A11, (Figura 8), HLA-B27 (Figura 9) y HLA-DR7 (Figura 10), de algunas muestras representativas del total analizado. Para cada análisis se utilizó como control positivo, DNA genómico tipificado previamente por métodos moleculares como positivo o negativo para los alelos correspondientes.

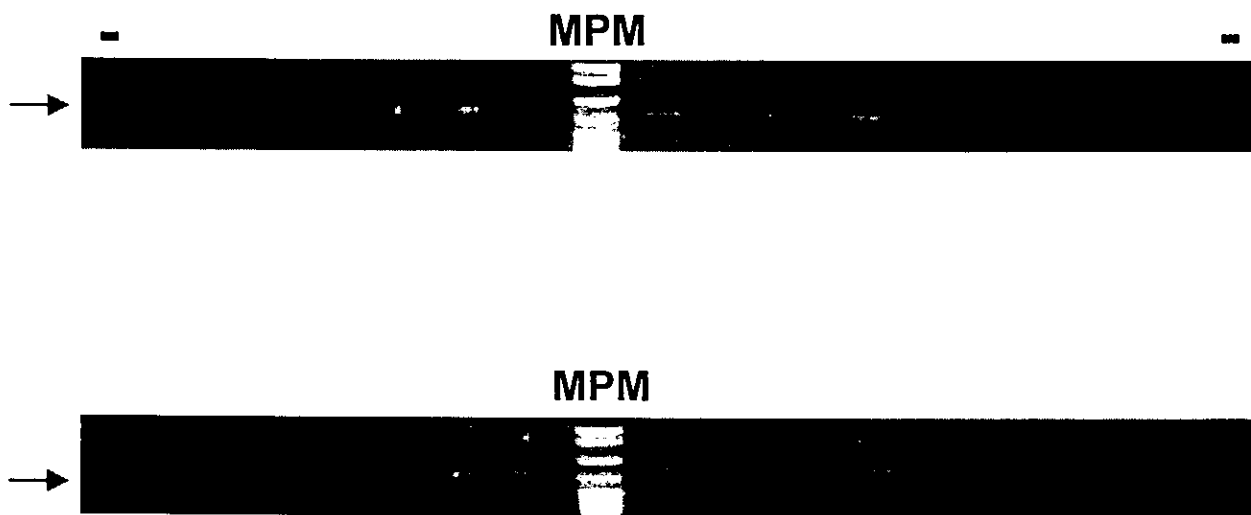


Figura 7 .- Análisis del producto de amplificación obtenido utilizando iniciadores específicos del gene β -2microglobulina. La presencia de este alelo fue analizada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia del gene. El producto de amplificación correspondió a una banda de 340 pares de bases (indicado con una flecha), que se detectó en un gel de agarosa al 2% preteñido con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular, indicado como MPM, fue pBR 322/Msp I. Los signos - indicados en la parte superior de la figura indica que en esos carriles no se aplicó muestra.

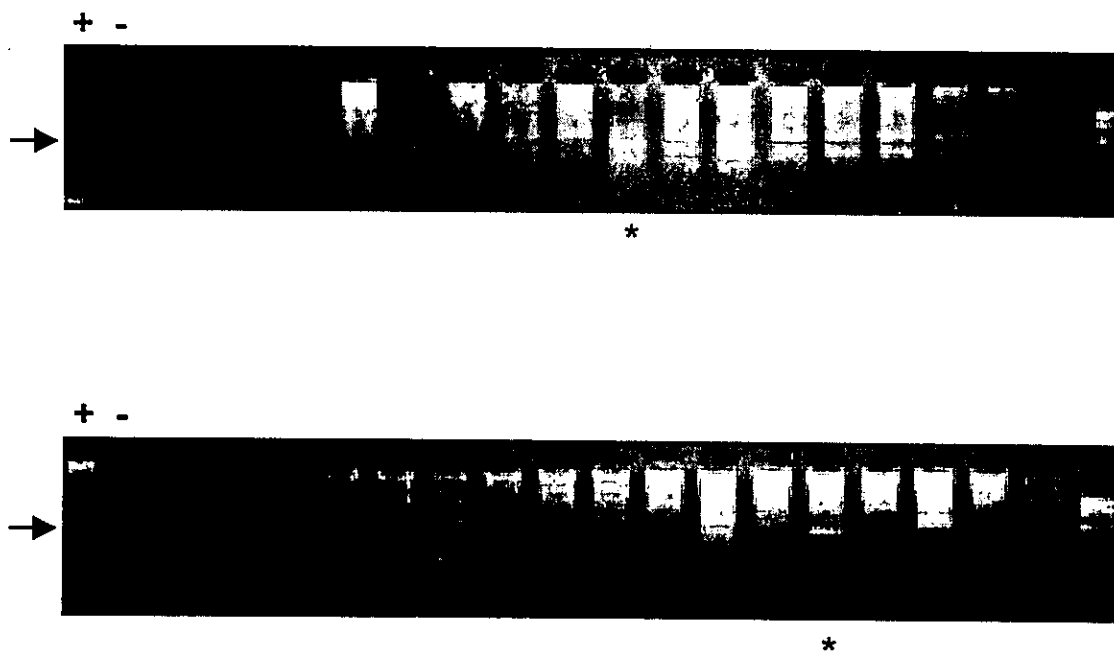


Figura 8.- Análisis del producto de amplificación obtenido con los iniciadores específicos del alelo HLA-A11. La presencia de este alelo fue analizada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos de los exones 2 y 3 del alelo. El producto de amplificación, detectado en un gel de agarosa al 2% preteñido con bromuro de etidio, correspondió a una banda de 518 pares de bases, indicado con una flecha en el carril indicado con + que corresponde al control positivo. El signo - en la parte superior de los geles, indica que en ese carril se aplicó el producto de amplificación correspondiente al control negativo. Los asteriscos (*) en la parte inferior de las figuras, indican los carriles positivos para el alelo A11.

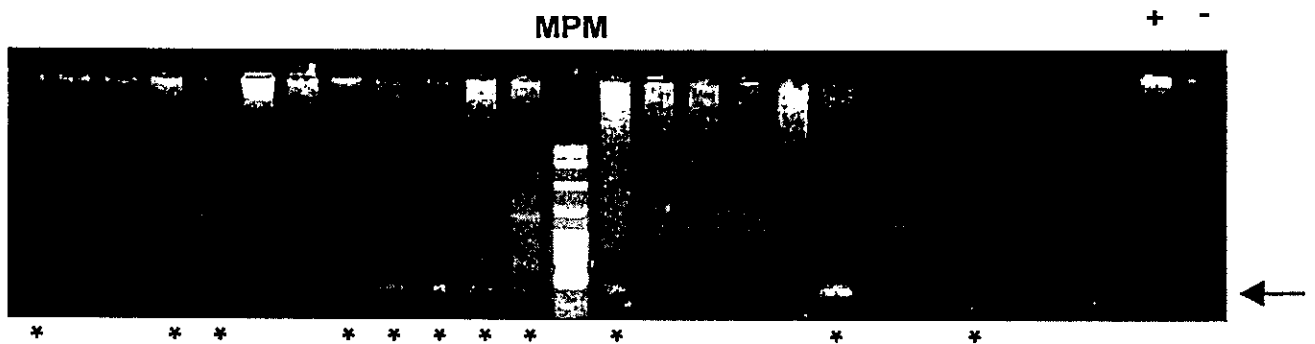


Figura 9.- Análisis del producto de amplificación obtenido con los iniciadores específicos del alelo HLA-B27. La presencia de este alelo fue analizada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos del exón 3 del alelo B27. El producto de amplificación, detectado en un gel de agarosa al 2% preteñido con bromuro de etidio, correspondió a una banda de 135 pares de bases, indicado con una flecha, claramente visible en el carril indicado con + que corresponde al control positivo. El signo - en la parte superior del gel, indica el carril con el producto de amplificación correspondiente al control negativo. Los asteriscos (*) en la parte inferior de los carriles indican las muestras positivas para el alelo B27. El marcador de peso molecular, indicado como MPM, fue pBR 322/Msp I.

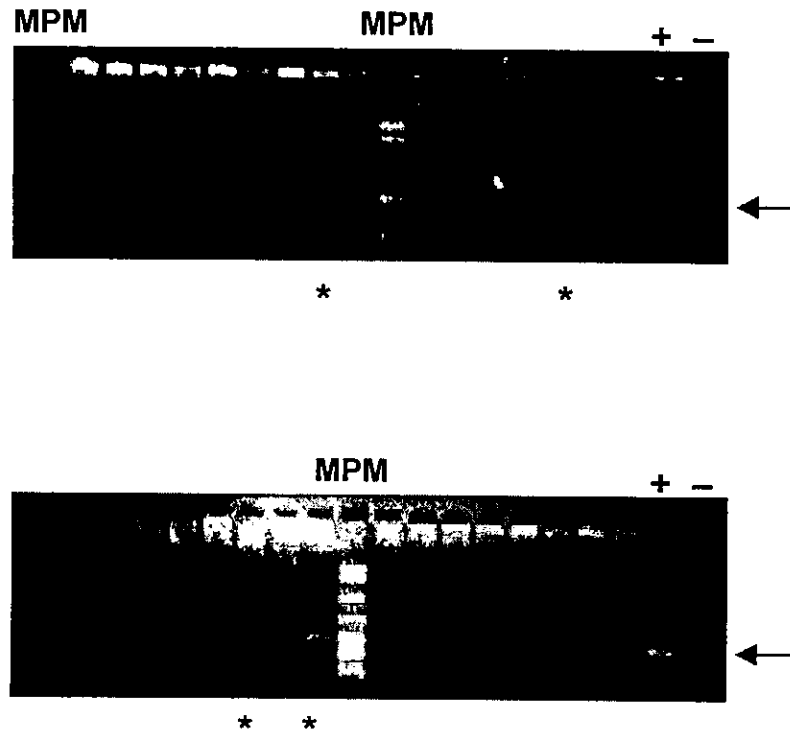


Figura 10.- Análisis del producto de amplificación obtenido con los iniciadores específicos del alelo HLA-DR7. La presencia de este alelo fue analizada por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región hipervariable del exón 2 del alelo DR7. El producto de amplificación esperado fue de 232 pares de bases, fue detectado en un gel de agarosa, al 2 %. La flecha en el extremo derecho de cada gel indica la banda correspondiente al producto de amplificación esperado. Con un signo + se señalan los carriles correspondientes a los controles positivos y con el signo - se señala el carril con control negativo. Los asteriscos (*) en la parte inferior de los carriles indican las muestras positivas para el alelo DR7. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado fue pBR 322/Msp I.

Frecuencia de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 en la población estudiada.

En la tabla VIII se presentan las frecuencias de los alelos en la muestra total analizada (n=83). La frecuencia en porcentaje para el alelo HLA-A11 fue de 8%, para el alelo HLA-B27 fue de 14% y para el alelo HLA-DR7 de 13%.

TABLA VIII.- Frecuencia de los alelos en la muestra total.

HLA-A11		HLA-B27		HLA-DR7	
Frecuencia ^a	%	Frecuencia ^a	%	Frecuencia ^a	%
7 / 83	8	12 / 83	14	11 / 83	13

^a Muestras positivas / total de muestras.

Para este análisis se consideró la muestra total analizada (n=83), sin categorizar en casos y controles.

Alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 y cáncer de piel de tipo no melanoma.

ALELO HLA-A11

Cuando se evaluó la presencia o ausencia del alelo HLA-A11 se encontró que 8% de los casos fueron positivos, mientras que estuvo presente en 9% de los controles, como se muestra en la Figura 11. Al realizar el análisis logístico se determinó una OR de 0.81 con una $p = 0.794$, como se muestra en la Tabla IX.

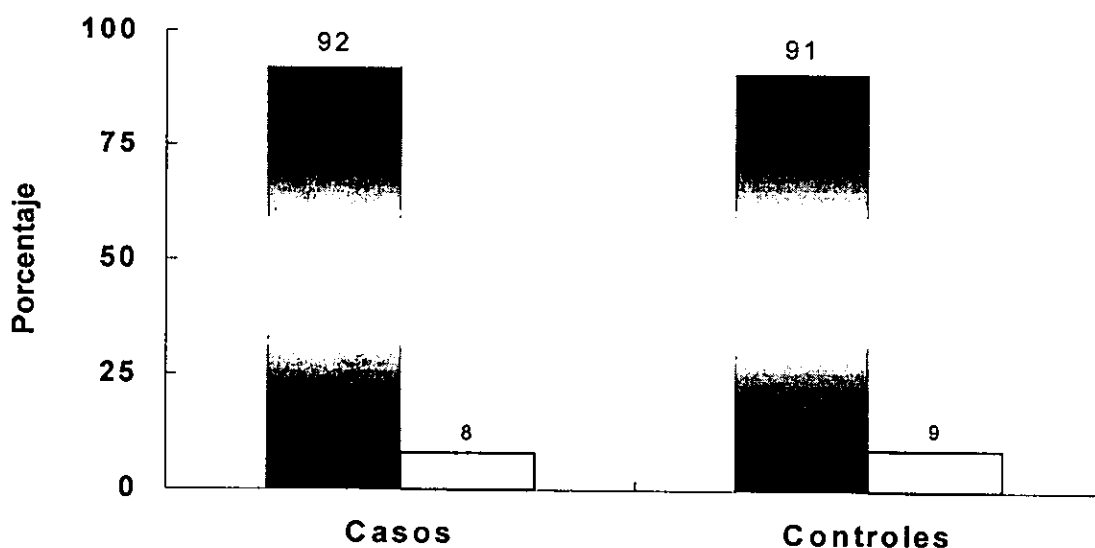


Figura 11.- Distribución del alelo HLA-A11 en casos y controles. Las barras grises representan la proporción de casos y controles que resultaron negativos para el alelo. Las barras vacías representan a los casos y controles que resultaron positivos para el alelo. La presencia de HLA-A11 se determinó con la técnica molecular PCR-SSP, detallada en Métodos.

TABLA IX.- Resultados del análisis logístico bivariado para el alelo HLA-A11

	HLA-A11 ⁺	HLA-A11 ⁻	OR ^a	p
Casos	3	36	0.81	0.794
Controles	4	39		

^a La determinación de la razón de momios se realizó con una regresión logística bivariada.

ALELO HLA-B27

El alelo HLA-B27 se encontró presente en el 13% de los casos y en el 14% de los controles, como se muestra en la Figura 12. Al realizar el análisis logístico bivariado se determinó una OR de 0.9, con una $p = 0.88$ (Tabla X).

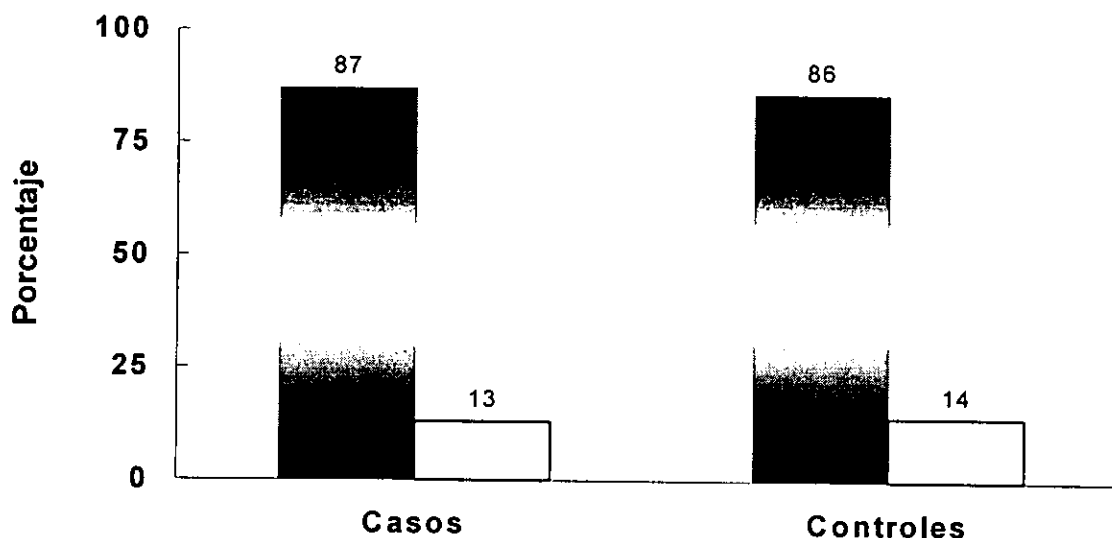


Figura 12.- Distribución del alelo HLA-B27 en casos y controles. Las barras grises representan a los casos y controles que resultaron negativos para el alelo. Las barras vacías representan los casos y controles positivos para la presencia de este alelo. La presencia de HLA-B27 se determinó con la técnica molecular PCR-SSP, descrita en Métodos.

TABLA X. Resultados del análisis logístico bivariado para el alelo HLA-B27

	HLA-B27 ⁺	HLA-B27 ⁻	OR ^a	p
Casos	5	34	0.90	0.880
Controles	6	37		

^a La determinación de la razón de momios se realizó por regresión logística bivariada.

ALELO HLA-DR7

Este alelo estuvo presente en el 18% de los casos, mientras que sólo estuvo presente en el 9% de los controles, como se muestra en la Figura 13.

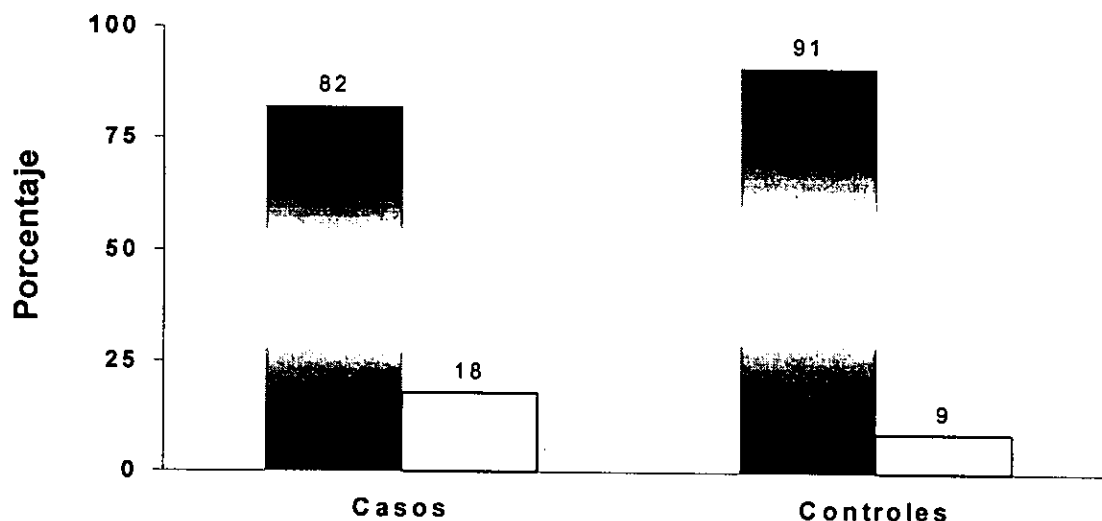


Figura 13.- Distribución del alelo HLA-DR7 en casos y controles. Las barras grises representan a los casos y controles que resultaron negativos para la presencia de este alelo, las barras vacías representan a los casos y controles positivos para la presencia de este alelo. La presencia de HLA-DR7 se determinó con la técnica molecular PCR-SSP, descrita en Métodos.

Cuando se analizó esta distribución por análisis logístico bivariado se encontró que la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla XI).

TABLA XI. Resultados del análisis logístico bivariado para el alelo HLA-DR7.

	HLA-DR7 ⁺	HLA-DR7 ⁻	OR ^a	p
Casos	7	32	2.13	0.251
Controles	4	39		

^a La determinación de la razón de momios se realizó por regresión logística bivariada.

Exposición actual a arsénico.

Para analizar si actualmente existe exposición a arsénico a través de la ingestión de agua contaminada, se utilizaron los resultados de la determinación de arsénico en la muestra de agua proveniente del domicilio de cada individuo incluido en el estudio. Como punto de corte para establecer la exposición, se consideró el límite máximo permitido de 50 $\mu\text{g/litro}$ (ATSDR 1989). Por debajo de este límite se consideró que el agua no representó una fuente de exposición.

Con este criterio, no se encontró significativa la exposición actual a arsénico a través del agua de bebida. Como se muestra en la Figura 14, sólo el agua del domicilio de 3 pacientes caso tuvieron concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/l}$, contra 2 muestras de agua obtenida de los domicilios de pacientes controles. Esto representó en porcentaje 8% de los casos y 5% de los controles.

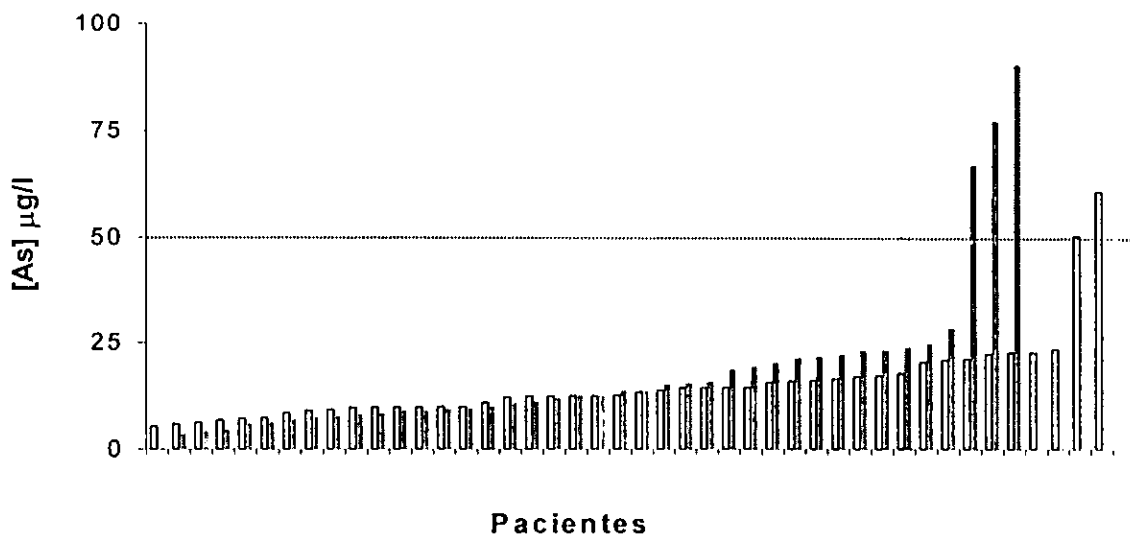


Figura 14.- Concentración de arsénico en el agua de bebida de casos y controles. Las barras grises representan a los casos y las barras vacías a los controles. No se encontraron diferencias significativas entre casos y controles al evaluar la exposición actual al realizar el análisis logístico bivariado. La concentración máxima permitida en el agua para beber es de 50 $\mu\text{g/l}$ (indicada como una línea interrumpida). La determinación de arsénico se realizó por espectrofotometría de absorción atómica como se describe en la sección de métodos.

Para evaluar la exposición actual de los pacientes, se midió la concentración de arsénico en orina. Los resultados gráficos de las concentraciones obtenidas para cada paciente se presentan en la Figura 15, y para el análisis se tomó como punto de corte 100 $\mu\text{g/l}$ (ATSDR 1989), considerando la exposición actual positiva si el contenido de arsénico en orina excedía este límite. Como se puede observar en la Figura 15 sólo 4 casos y 2 controles que representan el 11% y 5%, respectivamente, están expuestos actualmente (concentraciones $>100 \mu\text{g/l}$). El análisis estadístico de estos resultados no mostró diferencias significativas.

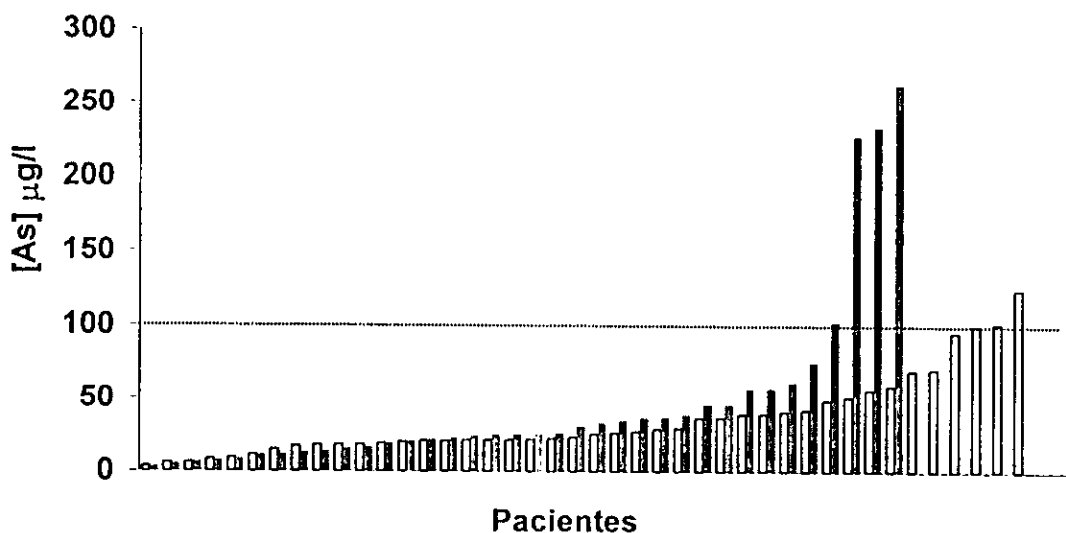


Figura 15. Concentración de arsénico en orina de casos y controles. Las barras grises representan a los casos y las barras vacías a los controles. No se encontraron diferencias significativas entre los 2 grupos al realizar el análisis logístico bivariado. La concentración máxima permisible es de 100 $\mu\text{g/l}$ (indicada con la línea interrumpida). La determinación de arsénico se realizó por espectrofotometría de absorción atómica y se encuentra descrita en Métodos.

Exposición histórica a arsénico.

Para estimar la exposición a arsénico de por vida para cada paciente, se utilizó la información obtenida a partir del cuestionario de la historia de residencia de cada paciente. Para estimar los niveles de arsénico en cada lugar de residencia y para el periodo de tiempo reportado por los pacientes, se utilizaron datos previamente reportados. La exposición histórica a arsénico (exposición diaria de por vida en ppb) se obtuvo de acuerdo al método publicado por Hsue y col. (Hsue *et al.*, 1995), como se indica en métodos. Los datos obtenidos para cada paciente se estratificaron en tres niveles históricos de exposición a arsénico (NHEAs) de acuerdo a la [As] diaria estimada de por vida, como sigue: nivel bajo: ≤ 5 ppb; nivel medio: 5.1-25 ppb; nivel alto: >25 ppb.

Al realizar el análisis de la exposición de por vida calculada para los pacientes caso y los pacientes control (estratificada de acuerdo a los niveles de exposición), encontramos que esta variable fue significativamente asociada con el desarrollo de cáncer de piel no melanoma (OR = 4.39 con una $p=0.005$), lo que significa que la exposición histórica a arsénico confiere un riesgo 3.39 veces mayor de desarrollar cáncer de piel, de un nivel de exposición a otro (Tabla XII).

TABLA XII. Resultado del análisis logístico bivariado para la exposición histórica a arsénico

Variable	OR	p	I. C. ^b	n
Exposición históricaa arsénico ^a	4.39	0.005	1.56 a 12.34	78

^a La concentración histórica de arsénico fue estimada como se describe en métodos. En base a la concentración (en ppb) diarias de por vida obtenida para cada paciente, los datos se distribuyeron en tres niveles históricos de exposición a As (NHEAs): Nivel bajo: ≤ 5 ppb; Nivel medio: 5.1- 25 ppb; Nivel alto: > 25.1 ppb. ^b Intervalo de confianza.

Características de los casos y controles con historia de exposición actual a arsénico.

Para evaluar las características de los pacientes que resultaron con [As] > 100 y 50 $\mu\text{g/l}$ en orina y en agua de su domicilio, respectivamente, en la Tabla XIII se presenta un concentrado donde se indican las concentraciones obtenidas de As en agua y en orina, así como algunas variables relacionadas con las posibles fuentes de exposición y los niveles históricos de exposición a As (NHEAs), en el cual se ubicó cada paciente. También se incluye la historia de exposición a luz solar (HELS) (ver otras covariables evaluadas, en esta sección de resultados, para niveles ver pie de Tabla XIII), así como la edad y el género de los pacientes, indicando además si se trata de casos o de controles.

Como puede observarse de los 5 pacientes cuyos valores en agua fueron superiores a la norma (A, B, C, D y E), sólo uno de ellos (paciente E) presentó concentraciones en orina arriba de 100 $\mu\text{g/l}$.

De los 6 pacientes con [As] > 100 $\mu\text{g/l}$ en la orina (E,F,G,H,I y J), el agua de 5 (F a J) mostró valores de As < a 50 $\mu\text{g/l}$ (excepto el paciente E previamente mencionado). Esto sugiere que en los pacientes con [As] en orina arriba de la norma, sólo en 1 la fuente de exposición puede atribuirse al consumo de agua de bebida de su domicilio (ver paciente E cuyo consumo diario de agua es 100 % de su domicilio). De los otros 5 pacientes con [As] en orina >100 $\mu\text{g/l}$ (F a J), 4 reportaron consumo de tabaco y notablemente 2 de los 4, prácticamente en el límite (paciente H con 103 $\mu\text{g/l}$ y paciente J con 101.7 $\mu\text{g/l}$). Obsérvese también

que excepto los pacientes E e I, los demás reportaron que entre el 0-50 % de su consumo diario de agua de bebida, lo hacen de fuentes diferentes a la domiciliaria. Esto sugiere que además del consumo de cigarrillos, en algunos pacientes la fuente de exposición debe ser externa a su domicilio.

Con relación a la presencia de cáncer de piel en estos pacientes, aún cuando la exposición actual tiene menor relevancia que la exposición histórica, realizamos el siguiente análisis. En los individuos A y B con cáncer de piel pero sin [As] en orina, el NHEAs fue alto (287.5 y 156.7 ppb respectivamente) además de que tuvieron HELS (nivel 4). Complementariamente, nótese que ambos pacientes son varones y se encuentran en la sexta y séptima década de su vida. Los dos controles con concentraciones elevadas de arsénico en el agua de bebida (C y D), tuvieron NHEAs alto (> 30 ppb) y HELS de nivel 1 y 3; ambos del género femenino y con una edad comparativamente menor a los casos (43 y 38 años).

Por otro lado, de los 6 pacientes con niveles de arsénico alto en orina (E, F, G, H, I, J), 4 correspondieron a casos y 2 a controles. Los pacientes caso, además de haber resultado con exposición actual a As, 3 de ellos tienen NHEAs alto (paciente E, F y G) aunque sólo uno tuvo HELS alto (nivel 4). El paciente caso H con nivel alto de As en orina, tuvo un NHEAs medio (8.25 ppb), pero con antecedentes importantes de HELS (nivel 4). Es notable que en estos pacientes, la distribución por género fue igual y la edad de todos fue entre 47 a 67 años.

Finalmente, los pacientes control con exposición actual a As (I y J), tuvieron NHEAs medio (< 20 ppb).

TABLA XIII .- Resumen de las características de casos y controles con [As] por encima de los niveles permitidos en agua de bebida y en orina.

		Exposición a As			Fuente agua bebida (% consumo/día)		Otras variables			
		Actual µg/l		Histórica			Fuma	Género	Edad (años)	HELS
		Agua	Orina	NHEAs	Domicilio	Otro				
A	C+	77.43	25.5	alto	50	50	0	M	56	4
B	C+	67.3	79.5	alto	60	40	1	M	63	4
C	C-	50.6	21.8	alto	73	27	0	F	43	1
D	C-	60.85	46.2	alto	66	33	0	F	38	3
E	C+	90.7	263.5	alto	100	0	0	F	63	1
F	C+	12.65	234.2	alto	42	17	0	F	47	1
G	C+	15.9	228.5	alto	0	100	2	M	67	4
H	C+	24.05	103	medio	33	66	1	M	63	4
I	C-	9.7	124.5	medio	80	20	1	F	54	1
J	C-	12.45	101.7	medio	50	50	1	M	63	4

C⁺ = casos; C⁻ = controles; Otro: consumo de agua o líquidos de una fuente diferente a la del domicilio. Fuma = Consumo de cigarrillos clasificado en los siguientes niveles: 0 = si el sujeto no fuma; 1 = consumo de 1-9 cigarrillos/día; 2 = consumo de 10-18 cigarrillos/día; 3 = consumo de 19 cigarrillos o más/día; M = masculino, F = femenino; HELS = exposición a luz solar medida como años trabajados en lugares abiertos, con cuatro niveles: 0 = sin historia de trabajo en lugares abiertos, 1 = hasta 5 años, 2 = de 6-15 años, 3 = de 16-30 años, 4 = 31 años de HELS en adelante. NHEAs: Nivel bajo: ≤ 5 ppb; Nivel medio: 5.1- 25 ppb; Nivel alto: > 25.1 ppb. ^b Intervalo de confianza.

Alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 en cáncer de piel no melanoma con y sin historia de exposición a arsénico.

Para tratar de explorar si la presencia de los alelos HLA estudiados contribuye de diferente manera en las poblaciones con diferentes niveles de exposición histórica a arsénico (NHEAs), evaluamos la distribución de cada uno de los pacientes positivos para los alelos, en los estratos de exposición definidos (Tabla XIV y Figura 16).

HLA-DR7.- De los 11 pacientes DR7⁺, 7 (64%) correspondieron a pacientes caso y solamente 4 (36 %) fueron controles. Su distribución de acuerdo a los NHEAs

mostró que 5 de los 7 pacientes caso DR7⁺ se ubicaron en el nivel de exposición alta y 2 en el nivel de exposición media (Tabla XV). De los 4 pacientes controles DR7⁺, 2 tuvieron NHEAs medio y 2 alto. La distribución de los datos sugiere que la presencia del alelo en población expuesta podría ser un factor que podría estar relacionado con un aumento en la susceptibilidad para que el cáncer de piel de tipo no melanoma se desarrolle, sin embargo no fue posible realizar el análisis estadístico, debido a que la *n* obtenida al estratificar las poblaciones por caso/control, por la presencia del alelo⁺/alelo⁻ y NHEAs, fue muy pequeña. Para tratar de definir que factores pueden intervenir para el desarrollo de cáncer en los pacientes caso DR7⁺ (y no en los DR7⁺ controles), se evaluaron las covariables indicadas en la Tabla XV, encontrando que: a) 5 de 7 casos DR7⁺, se ubicaron en el NHEAs alto, de éstos, 2 tuvieron historia de exposición a luz solar (HELS⁺) mientras que 3 tuvieron HELS⁻, b) los 2 casos DR7⁺ que se ubicaron en el NHEAs medio fueron HELS⁺. En relación a los pacientes control DR7⁺, se encontró que los 4 tuvieron HELS⁻ y todos fueron del género femenino.

HLA-B27.- Los 11 pacientes B27⁺ se distribuyeron como se muestra en la Tabla XIV (también ver Figura 16). Cinco pacientes B27⁺ correspondieron a individuos caso (3 ubicados en el NHEAs medio y 2 en el alto), y 6 fueron controles (5 con NHEAs medio y 1 de exposición alta). El análisis de los datos presentados en la Tabla XVI, mostró que de los 5 pacientes caso B27⁺, 2 también fueron DR7⁺, uno de ellos se ubicó en el NHEAs medio (HELS⁺) y el otro en el NHEAs alto (HELS⁻). De los otros 3 pacientes caso B27⁺, 1 se ubicó en el NHEAs alto y presentó HELS⁺,

TABLA. XIV.- Distribución de los alelos HLA-DR7, HLA-B27 y HLA-A11 en la muestra estratificado por casos y controles y por exposición histórica a As.

Alelo		Nivel de exposición histórica a As ^a									
		Baja				Media				Alta	
		+		-		+		-		+	-
		%	Frec. ^b	%	Frec. ^b	%	Frec. ^b	%	Frec. ^b	%	Frec. ^b
CASO	DR7	0	(0/39)	5	(2/39)	5	(2/39)	46	(18/39)	13	(5/39)
CONTROL		0	(0/43)	0	(0/43)	5	(2/43)	86	(37/43)	5	(2/43)
CASO	B27	0	(0/39)	5	(2/39)	3	(3/39)	44	(17/39)	5	(2/39)
CONTROL		0	(0/43)	0	(0/43)	12	(5/43)	79	(34/43)	2	(1/43)
CASO	A11	0	(0/39)	5	(2/39)	3	(1/39)	49	(19/39)	5	(2/39)
CONTROL		0	(0/43)	0	(0/43)	7	(3/43)	84	(36/43)	2	(1/43)

^aNivel de exposición histórica a As calculada como se indica en métodos. Los niveles de exposición se establecieron de acuerdo a las siguientes [As]: E. baja: ≤ 5 ppb.; E. media: 5.1-25 ppb. y alta: ≥ 25.1 ppb. ^bFrecuencia= No. de ocurrencia / n total de casos o controles).

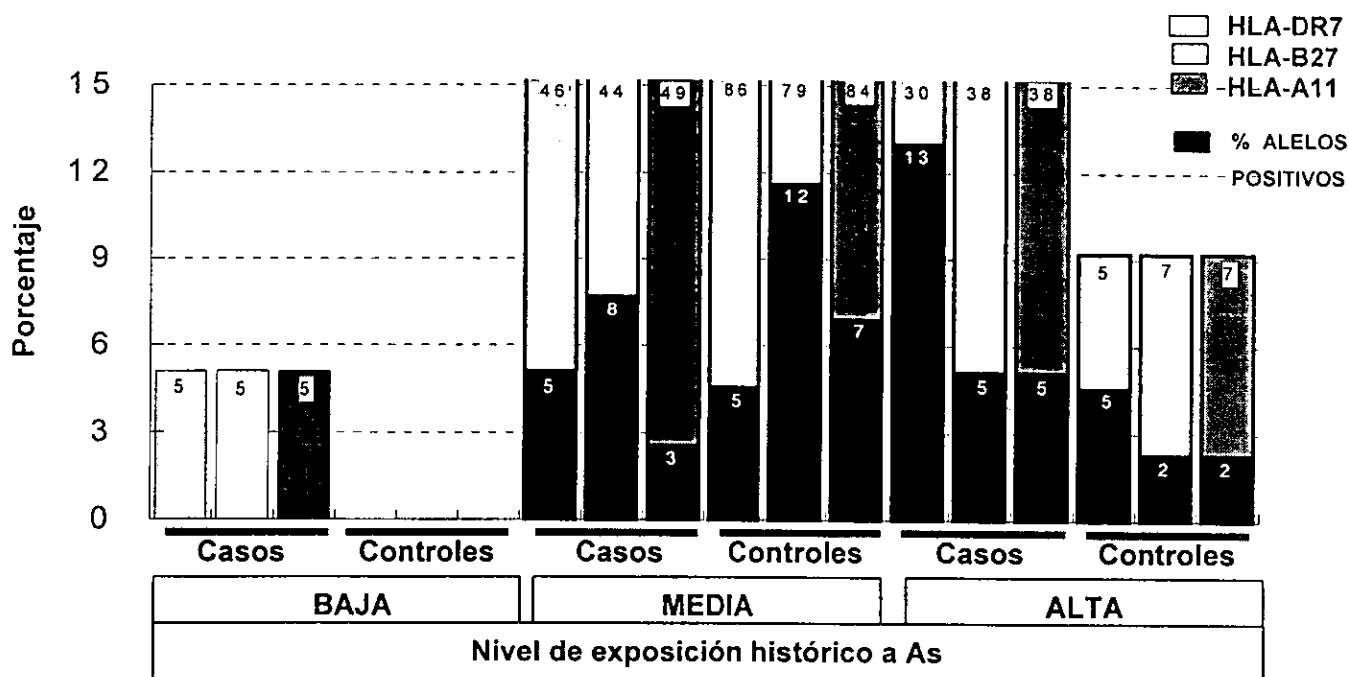


Figura 16.- Distribución de los alelos HLA-DR7, HLA-B27 y HLA-A11 en casos y controles estratificados por la exposición histórica a As. Los niveles de exposición se establecieron de acuerdo a las [As]: exposición baja: ≤ 5 ppb.; E. media: 5.1-25 ppb. y E. alta ≥ 25.1 ppb. La distribución por alelos se indica en el extremo derecho de la gráfica. Las porciones negras en la base de las barras corresponden al % de positividad que cada alelo tuvo en los casos y controles distribuidos de acuerdo a los niveles de exposición histórica a As. La parte superior de cada barra representa el % negativos para cada alelo. Los números en el cuerpo de cada barra indican el valor en porcentaje.

TABLA XV.- Concentrado de casos y controles HLA-DR7⁺ y características relacionadas con exposición histórica a arsénico, luz solar, género y edad.

	HLA-DR7	HLA-B27	HLA-A11	NHEAs	HELs	Genero	Edad (años)
CASOS	+	-	+	alta	+	M	60
	+	-	-	alta	+	M	57
	+	-	-	alta	-	M	47
	+	-	-	alta	-	M	56
	+	+	+	alta	-	F	63
	+	+	-	media	+	M	64
	+	-	-	media	+	F	62
CONTROLES	+	-	-	alta	-	F	38
	+	-	+	alta	-	F	31
	+	-	-	media	-	F	29
	+	-	-	media	-	F	69

NHEAs= nivel de exposición histórica a As calculada como se indica en métodos (también ver pie de tabla XIV); HELs= historia de exposición a luz solar medida como exposición promedio diaria en horas. Se consideró exposición positiva (+) si el sujeto se expuso diariamente por más de 4 h al día, y negativa (-) si el sujeto se expuso menos de 4 h diarias a lo largo de su vida; M= masculino, F= femenino

mientras que 2 estuvieron en el NHEAs bajo y con HELs⁻ (correspondieron a 1 varón y una mujer). Con relación a los pacientes control B27⁺: 5 de 6 fueron NHEAs bajo y 1 fue NHEAs alto. Solo 1 de los NHEAs medio fue HELs⁺, pero fue de sexo femenino. De hecho 5 de los 6 controles B27⁺ correspondieron al género femenino y sólo uno fue masculino.

TABLA XVI.- Concentrado de casos y controles HLA-B27⁺ y características relacionadas con exposición histórica a arsénico, luz solar, género y edad.

	HLA-DR7	HLA-B27	HLA-A11	NHEAs	HELs	Genero	Edad (años)
CASOS	-	+	-	medio	-	M	52
	-	+	-	medio	-	F	51
	+	+	-	medio	+	M	64
	+	+	+	alto	-	F	63
	-	+	-	alto	+	M	75
CONTROLES	-	+	-	medio	-	M	68
	-	+	-	medio	-	F	62
	-	+	-	medio	-	F	67
	-	+	-	medio	-	F	34
	-	+	+	medio	+	F	46
	-	+	-	alto	-	F	43

NHEAs= nivel de exposición histórica a As calculada como se indica en métodos (también ver pie de tabla XIV); HELs= historia de exposición a luz solar medida como exposición promedio diaria en horas. Se consideró exposición positiva (+) si el sujeto se expuso diariamente por más de 4 h al día, y negativa (-) si el sujeto se expuso menos de 4 h diarias a lo largo de su vida; M= masculino, F= femenino

HLA-A11.- Los 7 pacientes A11⁺, se distribuyeron como se muestra en la Tabla XIV y Figura 16. De estos, 3 de 7 correspondieron a individuos caso (1 ubicado en el NHEAs medio y 2 en el alto), y 4 fueron controles (3 con NHEAs medio y 1 con NHEAs alto).

El análisis de los datos presentados en la Tabla XVII, mostró que los 2 casos con NHEAs alta también fueron DR7⁺ y uno de ellos tuvo HELS⁺. De los pacientes control A11⁺, 3 de 4 fueron NHEAs medio y 1 fue NHEAs alto. Sólo 1 de los 4 NHEAs medio fue HELS⁺. Todos los controles A11⁺ fueron del género femenino.

TABLA XVII.- Concentrado de casos y controles HLA-A11⁺ y características relacionadas con exposición histórica a arsénico, luz solar, género y edad.

	HLA-DR7	HLA-B27	HLA-A11	NHEAs	HELs	Genero	Edad (años)
CASOS	+	-	+	alto	+	M	60
	+	+	+	alto	-	F	63
	-	-	+	medio	-	F	73
CONTROLES	+	-	+	alto	-	F	31
	-	+	+	medio	+	F	46
	-	-	+	medio	-	F	34
	-	-	+	medio	-	F	48

NHEAs= nivel de exposición histórica a As calculada como se indica en métodos (también ver pie de tabla XIV); HELs= historia de exposición a luz solar medida como exposición promedio diaria en horas. Se consideró exposición positiva (+) si el sujeto se expuso diariamente por más de 4 h al día, y negativa (-) si el sujeto se expuso menos de 4 h diarias a lo largo de su vida; M= masculino, F= femenino

Papel de otras covariables como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma.

Debido al riesgo atribuido a la exposición a luz solar para el desarrollo de cáncer de piel en general, se decidió incluir en este trabajo, los resultados del análisis de esta covariable, la cual se determinó como sigue: La exposición a luz solar por

ambiente de trabajo, se evaluó a través del cuestionario, y la exposición se estimó a partir del número de años que se desarrollaron labores en lugares abiertos (independientemente del tiempo de exposición diaria), obteniéndose la sumatoria por periodos de edad y estableciéndose 4 niveles que incluyeron: Nivel 1) Individuos de 0- 5 años con empleo extramuros; Nivel 2) Individuos de 6-15 años con empleo extramuros; Nivel 3) Individuos de 16-30 años con empleo extramuros; Nivel 4) Individuos con 31 años o más con empleo extramuros.

De acuerdo a estos criterios, encontramos que el 42 % de los pacientes caso se expusieron ocupacionalmente de forma crónica durante 15 años debido a que realizaban actividades laborales en sitios abiertos, mientras sólo el 19% de los controles presentaron antecedentes de exposiciones equivalentes (ver Figura 17). Cuando se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos para la exposición a luz solar por actividades de trabajo, se encontró una $OR=1.64$, ($p=0.009$) lo cual quiere decir que el riesgo para desarrollar cáncer de piel se incrementa 64% de un nivel de exposición a otro.

Para evaluar la importancia que tiene la exposición diaria a la luz solar, utilizamos el promedio de exposición diaria en h. Como se puede ver en la Figura 18 el 76% de los controles y el 50 % de los casos resultaron con una exposición promedio de hasta 4 h. Este tiempo (4 h) ha sido utilizado como punto de corte entre una exposición diaria baja y una exposición alta a la luz solar (Maurer 1997). El 50 % de casos restantes se distribuyó en los periodos de exposición promedio >4 h, mientras que sólo el 24 % de los controles se ubicó en estos rangos. Al realizar el análisis estadístico resultó una $OR=1.32$ ($p =0.010$), lo cual quiere decir que el riesgo se incrementa en 32% con cada hora que el sujeto se expone a la luz solar.

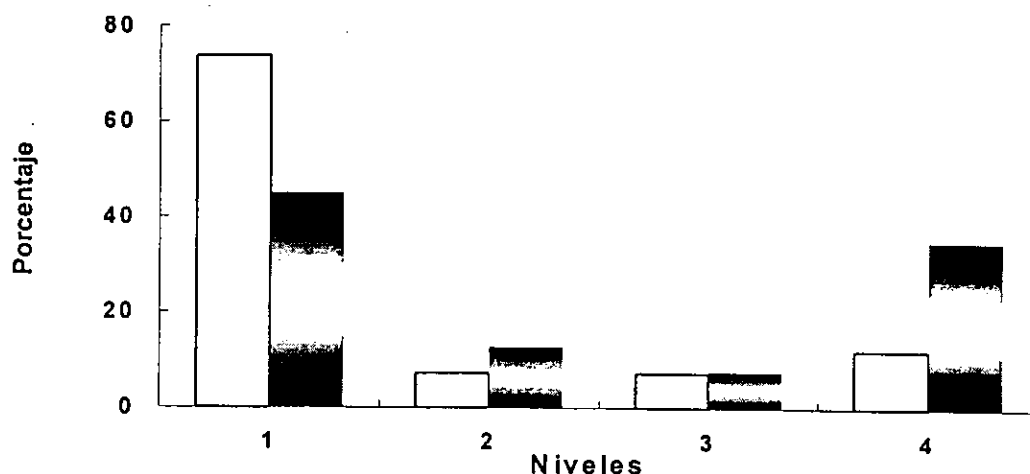


Figura 17.- Exposición a sol por ambiente de trabajo. Las barras grises representan los casos y las barras vacías los controles. El 42% de los casos se ubicaron en los niveles 3 y 4, comparado con el 19% de los controles. En el nivel 1 se consideró la menor exposición y el nivel 4 agrupó a los de mayor exposición (más años con empleos expuestos a luz solar). Para construir los niveles se consideró el tiempo en años trabajados con exposición a luz solar. El Nivel 1 incluye de 0-5 años con empleos expuestos a la luz del sol. El Nivel 2 de 6-15 años, el Nivel 3 de 16-30 años, el Nivel 4 31 o más años con empleos expuestos a la luz solar.

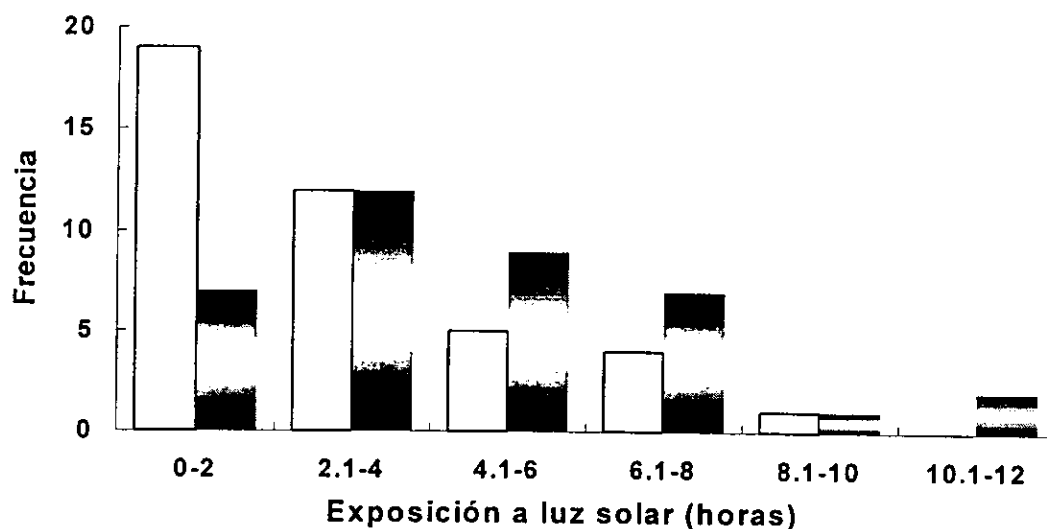


Figura 18.- Distribución de la población por promedio diario de exposición a luz solar. Las barras grises representan a los casos y las barras vacías a los controles. El 51% de los casos estuvieron expuestos por más de 4 h diarias a lo largo de toda la vida, mientras que sólo el 23 % de los controles tuvieron la misma exposición. Para determinar el promedio de h diarias se sumaron las h por cada periodo de edad y se dividió entre el número de periodos de edad de cada paciente.

Para investigar otras covariables que en nuestra población pudiesen contribuir confiriendo riesgo o protección para el desarrollo de cáncer de piel, se consideró la información del cuestionario, y se realizó el análisis multivariado con todas las variables que resultaron significativamente asociadas en el análisis bivariado. El resultado del análisis multivariado se presenta en la Tabla XVIII, donde se puede ver que la edad permaneció como factor de riesgo con una OR=1.08 ($p= 0.002$), indicando que por cada año que el individuo envejece, el riesgo de desarrollar cáncer de piel se incrementa en un 8%. El género fue otro factor de riesgo que permaneció en el modelo (OR=5.69 con una $p= 0.004$). Esto significa que de acuerdo a nuestro estudio, el género masculino tiene 4.6 veces más riesgo de desarrollar cáncer de piel no melanoma, que el género femenino. Finalmente, la exposición histórica a arsénico permaneció como un factor que confiere 3.2 veces mayor riesgo para que desarrollen cáncer de piel no melanoma en los individuos expuestos contra los que nunca se expusieron a ese xenobiótico (OR=4.27 con una $p=0.028$).

TABLA XVIII.- Resultado del análisis logístico multivariado

Variable	OR	p	Intervalo de Confianza	n
Edad	1.08	0.002	1.03-1.14	83
Género	5.69	0.004	1.76-18.36	
Exposición histórica a arsénico	4.27	0.028	1.16-15.64	

Este modelo se originó a partir de las variables que resultaron significativamente diferentes entre casos y controles en el análisis bivariado. Las variables que se incluyeron en el análisis multivariado fueron edad (OR=1.09 $p\leq 0.000$), exposición al sol (OR=1.32 $p=0.010$), exposición histórica a arsénico (OR=4.39 $p\leq 0.005$), tabaquismo (OR=2.18 $p=0.008$), género (OR=11.66, $p= 0.000$), grado escolar (OR=0.48 $p=0.000$), nivel económico (OR=0.43, $p=0.011$) y alimentación (OR=0.62, $p= 0.010$).

VII. DISCUSIÓN

El cáncer es un proceso multifactorial en el que intervienen características del individuo (factores genéticos, edad, género, estado nutricional, etc.), factores ambientales (radiación solar, la contaminación del agua de bebida por la existencia de suelos contaminados con químicos --como el arsénico--), infecciones con ciertos tipos de virus capaces de transformar las células que infectan y cuya presencia está asociada con ciertos tipos de cáncer en humanos [por ejemplo el virus de papiloma (HPV)] y factores sociales que determinan el nivel de educación de los individuos y el que éstos se expongan ocupacionalmente a determinadas sustancias químicas sin medidas de protección adecuadas (ASC 1998, Ellison *et al.* 1998, Bavinck *et al.* 1993). Por lo anterior, es clara la dificultad para definir el conjunto de todos los factores que contribuyen al desarrollo de cualquier tipo de cáncer, y también lo improbable de que estas patologías tengan como etiología un único factor.

Conociendo esto, en nuestro grupo de trabajo, se planteó un proyecto general para tratar de establecer diferentes factores de susceptibilidad y riesgo asociados con el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, asociado a la exposición a factores ambientales como la luz UV y diversas sustancias químicas como el arsénico (Streilein 1996, ASC 1998). Para este estudio se eligió una población humana proveniente de una región (Región Lagunera) en la cual una subpoblación está expuesta a arsénico a través de agua de bebida y en la cual se ha asociado dicha exposición con el desarrollo de cáncer de piel de tipo no

melanoma (Cebrián *et al.*, 1983; ATSDR 1989). Sin embargo, en pocos estudios se han evaluado otros factores tanto ambientales como individuales que pueden estar involucrados en la mayor prevalencia de cáncer de piel en estas poblaciones, incluyendo la contribución de factores como exposición a luz UV, edad, género, etc., (previamente reportados) (ASC 1998, Vitasa *et al.* 1990) así como factores escasamente explorados, como los factores genéticos.

Con el fin de evaluar la presencia y coexistencia de factores tanto del individuo como de su ambiente en el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, se planteó un proyecto general que incluye tres proyectos particulares, de los cuales el presente es uno de ellos y fue dirigido de manera particular a evaluar algunos aspectos genéticos (alelos de HLA) como factores de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma. Los otros dos proyectos particulares están dirigidos a: 1) El trabajo de campo y el análisis estadístico formal de todos los datos obtenidos a partir de la historia clínica dermatológica y de exposición (Torres Vargas, en preparación) y, 2) La evaluación del papel del virus de papiloma humano como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma en humanos expuestos crónicamente a arsénico (Rosales Castillo, en preparación).

Debido a que este proyecto buscó evaluar factores genéticos asociados con el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, fue necesario realizar un estudio de casos y controles. Este tipo de estudios, al igual que los de cohorte, permiten valorar la relación entre enfermedad y una característica que se presume

aumenta o disminuye la probabilidad de desarrollar la enfermedad. El estudio de caso-control es más utilizado que los estudios de cohorte debido a que requiere un tamaño de muestra menor, ya que tiene como característica particular que la selección de sujetos se hace en base al estado patológico. Los casos se seleccionan de las personas que tienen la enfermedad de interés y los controles se eligen entre las personas que no la tienen. Ambos se seleccionan de una misma población (llamada población fuente). En nuestro estudio la población fuente fue la consulta de Dermatología del Hospital de Especialidades No. 71 del IMSS de la Cd. de Torreón. Esto es, fue un estudio de casos y controles hospitalarios.

En este estudio se incluyeron 2 tipos de lesiones cancerosas de tipo no melanoma: el cáncer de células epidermoides y el cáncer de células basales. Se consideraron ambos debido a que el cáncer epidermoide es el asociado con mayor frecuencia a la exposición crónica a arsénico, pero también el carcinoma de células basales ha sido relacionado (ATSDR 1989).

Cabe mencionar que en la clasificación de carcinoma epidermoide, en este trabajo se incluyó a las lesiones diagnosticadas como enfermedad de Bowen y las hiperqueratosis. Esto debido a que el carcinoma de células epidermoides se ha sugerido se desarrolla a partir de algunas capas hiperqueratinizadas (la hiperqueratosis es considerada una lesión premaligna) (ATSDR 1989), y la enfermedad de Bowen se ha catalogado como un carcinoma de células escamosas intraepidérmicas (cáncer *in situ*), y también se asocia con la ingestión crónica de arsénico inorgánico (Orkin *et al.* 1994). De hecho para verificar que la

inclusión de los casos con diagnóstico de hiperqueratosis de origen arsenical, no influyeran en los resultados del papel de arsénico, se realizó un análisis de sensibilidad. Para ello se hizo el análisis bivariado incluyendo y sin incluir las hiperqueratosis. Los resultados mostraron que en ambos análisis se obtuvo asociación significativa de la historia de exposición a arsénico con el desarrollo de cáncer.

Con relación a este trabajo, el interés fundamental fue evaluar la presencia y la asociación de tres alelos (HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7) del Complejo Principal de Histocompatibilidad, como posibles marcadores de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma, así como el papel de la exposición a arsénico. Al final de esta sección también discutiremos los resultados que obtuvimos con relación a la exposición a luz solar, género y edad, con la finalidad de presentar un panorama de la diversidad de factores que contribuyen con el proceso canceroso. Por lo mismo en la parte final discutiremos brevemente los resultados de todos los factores, incluyendo al arsénico, que resultaron asociados con el desarrollo de cáncer de piel en nuestro estudio, a la luz de los análisis bivariados y el multivariado.

En la primera parte discutiremos los resultados obtenidos con relación a los alelos HLA como factores de susceptibilidad genética en nuestra población de estudio, así como del papel del arsénico como factor de riesgo.

Alelos HLA como factores de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma.

La principal razón para evaluar factores se debe a que ha sido propuesto que éstos contribuyen aproximadamente con una tercera parte o la mitad del riesgo para la mayoría de las enfermedades (Rose *et al.* 1998). Un número de genes tanto HLA como genes que no pertenecen a este *loci*, contribuyen a la predisposición de muchas enfermedades. Estos genes actúan en diversas formas: a) influyendo la respuesta inmune o modulando el repertorio inmune, b) contribuyendo en la regulación del sistema inmune y c) afectando la vulnerabilidad del órgano blanco (Rose *et al.* 1998).

En algunos sujetos la carga acumulada de riesgo genético es tal que el individuo está siempre "en el borde" para desarrollar la enfermedad, en otros, el riesgo es tan débil que se necesita un fuerte estímulo ambiental para desencadenar la enfermedad (Rose *et al.* 1998). De hecho, en los últimos 20 años ha sido bien documentado que existen asociaciones de HLA con enfermedades autoinmunes principalmente (Kwok *et al.* 1998).

Con respecto a los alelos de HLA que nosotros hemos estudiado en este trabajo, la razón para elegir algunos de los alelos que han sido reportados como de susceptibilidad a cáncer de piel en individuos inmunosuprimidos con fines de transplante renal obedece a lo siguiente: en nuestro país existen poblaciones expuestas en forma crónica a arsénico a través del agua de bebida en donde está reportada una mayor prevalencia de cáncer de piel de tipo no melanoma (Cebrián *et al.* 1983). Con relación a esto, ha sido sugerido por estudios en humanos y en

modelos experimentales que el arsénico induce un estado de permisividad inmune, que puede deberse a una reducción en la respuesta de protección mediada por células, lo cual potencialmente permitiría el escape de células tumorales a los mecanismos de protección inmunológica y que esto podría relacionarse con el desarrollo de lesiones dérmicas y cáncer de piel (Burns *et al.* 1994, Gonsebatt *et al.* 1994). Este estado de permisividad inmune podría representar una homología entre ambas poblaciones, aunque evidentemente el grado de alteración de la respuesta inmune debida a la exposición ambiental a sustancias químicas, pocas veces alcanza la gravedad de la inducida por medicamentos inmunosupresores.

Por otro lado, los estudios en poblaciones humanas tratando de asociar alelos de HLA con el desarrollo de cáncer de piel son pocos (ver sección de polimorfismo de HLA y cáncer de piel y tabla III en antecedentes de esta tesis). Además, dichos estudios se han realizado en poblaciones de diferentes continentes, obteniéndose resultados controvertidos. Esto resulta especialmente interesante si recordamos que la región HLA es probablemente la región más polimórfica del genoma humano cuyos productos juegan un papel muy importante en la respuesta inmune. También es importante mencionar que en diversos estudios se ha encontrado que los mismos alelos HLA son factores de protección o de riesgo cuando se analizan diferentes poblaciones (Bavinck *et al.* 1997, Boyle *et al.* 1984, Barr *et al.* 1989, Hartevelt *et al.* 1990, Bavinck *et al.* 1991). Como ejemplo está el alelo HLA-DQ3 que ha sido encontrado en población Italiana como factor de protección para melanoma (Marincola *et al.* 1992), pero en población caucásica Americana se

encontró como un factor de riesgo para la misma enfermedad (Muto *et al.* 1996). Es pertinente mencionar que el melanoma, aunque no es el tipo de cáncer de piel desarrollado en poblaciones inmunosuprimidas por medicamentos o por exposición crónica a arsénico, es un tumor considerado altamente inmunogénico, ya que los melanocitos son células que expresan antígenos HLA de Clase II y pueden funcionar como células presentadoras de antígenos, (Le Poole *et al.* 1993).

Los resultados obtenidos para HLA-DQ3 , han generado controversia pero se ha propuesto pueden ser explicados parcialmente por las variaciones étnicas en las frecuencias HLA o a la heterogeneidad de factores genéticos y ambientales como infecciones virales y bacterianas, dieta, etc. (Lulli *et al.* 1996).

En nuestro trabajo, nosotros utilizamos estrategias moleculares para determinar la presencia de los alelos, debido a que el esfuerzo se dirigió a tres alelos en particular, dos de clase I : HLA-A11, HLA-B27 y uno de clase II: HLA-DR7. Los tres como se mostró previamente (sección de antecedentes) han sido previamente asociados con protección y/o riesgo en otras poblaciones.

Es importante recordar que debido a que no existen datos de frecuencia de alelos de HLA en la mayoría de las regiones de la población mestiza mexicana, y que la Región Lagunera no es la excepción, una parte importante de nuestro trabajo fue determinar la frecuencia de los tres alelos de interés en la población de estudio. Las frecuencias obtenidas para los tres alelos fue de 8, 14 y 13 % para HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7, respectivamente. Estos datos, son importantes, para

estudios posteriores en los cuales el interés sea evaluar la posible asociación de estos alelos con otras patologías.

Con relación a la asociación de los alelos con el desarrollo de cáncer de piel no melanoma, nosotros encontramos que no hubo asociación entre HLA-A11 y el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma ni como factor de riesgo ni como factor de protección, ya que la OR obtenida fue de 0.81 con una $p=0.79$. Debe recordarse que previamente este alelo ha sido asociado principalmente con protección en estudios realizados en población Holandesa, Italiana, Inglesa y Australiana (del sur Australia), aunque también existe un reporte en Australia (Queensland) donde se encontró como un factor de riesgo (ver Tabla III). Estas controversias, como ya se mencionó, no son raras en estudios en donde se trata de relacionar HLA con enfermedad.

Con relación al alelo HLA-B27, nosotros tampoco obtuvimos asociación estadística con el desarrollo de cáncer de piel no melanoma (OR de 0.90 con $p= 0.88$). Estos resultados sugieren que no existe asociación de este alelo con cáncer de piel a diferencia de los datos previos en otras poblaciones en los cuales se encuentra como un factor de riesgo (Bavinck *et al.* 1990 y 1991a; Czarnecki *et al.* 1992 b y c). Quisiera enfatizar que para definir el papel de B27, consideramos es necesario ampliar el tamaño de la muestra estudiada, de manera que nos permita verificar o rectificar que los resultados que obtuvimos hasta el momento no muestran asociación del alelo HLA-B27 con el desarrollo de cáncer que estudiamos.

Los resultados obtenidos con el alelo HLA-DR7 (Tabla XIII), propuesto en otros estudios como alelo que confiere riesgo (Czarnecki *et al.* 1992b y 1992c), muestra también la misma tendencia (OR= 2.13) sin embargo, no se encontró asociación estadísticamente significativa ($p=0.25$).

Aquí es pertinente comentar que en los dos trabajos previamente publicados con relación a DR7 y su asociación con cáncer de piel de tipo no melanoma, en uno se asocia encontró como factor de riesgo (OR = 2.16 con $p=0.02$) , mientras que en el otro se reportó una OR=1.4 pero con $p=0.35$, sugiriendo solamente una tendencia como factor de riesgo (Czarnecki 1992 b,c; Bavinck *et al.* 1990). Nuestros resultados, con una OR=2.13 ($p= 0.25$) también sugieren riesgo aunque no fue significativa estadísticamente. Como en el caso de los alelos HLA clase I evaluados, consideramos que para verificar la tendencia de estos datos, es necesario un tamaño mayor de muestra.

Como se mencionó líneas arriba, consideramos que uno de los factores que pudiera influir en los resultados del análisis de los alelos HLA fue el tamaño de muestra analizado. En ocasiones, se pueden encontrar asociaciones estadísticas significativas con muestras pequeñas como en el estudio de HLA-A3 en población holandesa en donde Bavinck *et al.* obtiene significancia estadística con 66 casos y 126 controles (Bavinck *et al.*, 1991a) (Tabla III). Esto, sin embargo, en general tiene relación con la frecuencia de los alelos en la población.

De acuerdo a nuestros resultados, consideramos necesario reevaluar la asociación de los tres alelos, en particular el DR7, en el marco de un número de

muestra mayor al actual (ver adelante), con el objeto de obtener resultados concluyentes sin que el tamaño de muestra represente un factor de incertidumbre.

Con base en lo anterior, consideramos que dos contribuciones importantes del presente estudio fueron: 1) establecer la frecuencia de estos alelos en la Región de la Laguna, y 2) calcular a partir de los datos de este trabajo, el tamaño de muestra necesario para obtener resultados, para cada alelo de interés, en un intervalo de confianza adecuado (95 %). La posibilidad de establecerlos como marcadores moleculares de susceptibilidad radicará en el éxito que se tenga de captar los casos y los controles por el tiempo necesario para alcanzar el tamaño de muestra que calculamos a partir de nuestros resultados (ver Tabla XIX).

Tabla XIX. Tamaños de muestras calculados, a partir de los datos obtenidos en este trabajo, necesarios para evaluar las asociaciones con los alelos HLA estudiados.

Calculando el 95 % de Intervalo de Confianza	Alelo	n
$\beta=80$	HLA-DR7	225
	HLA-B27	17172
	HLA-A11	2888

Los cálculos se realizaron con el programa EPIDAT 2.1 en base a los resultados del estudio piloto

Para ello, será necesario contar con colaboradores en la región de estudio convencidos de la importancia de este tipo de estudios en regiones en donde la contaminación del subsuelo o la contaminación por medios antropogénicos es alta, como sucede en la Región de la Laguna.

Con relación al tamaño de muestra debe hacerse dos precisiones: 1) El tamaño de muestra obtenido de casos incidentes de cáncer de piel de tipo no melanoma en la Laguna, fue menor (en un 50 %) que el estimado inicialmente por los Dermatólogos. Debe hacerse notar que el tamaño de la muestra, no fue suficiente sólo para el análisis de los alelos HLA, pero no impactó los resultados del análisis del efecto del arsénico y otras covariables evaluadas, en las cuales se tuvo la potencia y significancia estadística suficiente, 2) Durante ese periodo se capturaron todos los casos posibles a través de la consulta de Dermatología, e incluso se revisaron las listas de consultas de los años 1994, 1995, 1996. Con relación a esto último, del total de casos reportados en esos periodos: i) varios pacientes ya se habían captado en la consulta de 1997-98 debido a que fueron casos reincidentes, ii) debido a que los pacientes caso en general son de edad avanzada (mayores de 70 años), algunos ya habían fallecido o no fue posible su localización en virtud de que cambiaron de domicilio o habían sido dados de baja del sistema de Salud.

De lo anterior es claro que sería una ventaja el contar con un Registro Nacional confiable de casos de cáncer de piel (y en general de cualquier tipo de patología), que facilitaría los estudios para evaluar asociaciones HLA-cáncer de piel. Esto permitiría acceder a la población de interés en un período cualquiera, ayudando con esto a alcanzar tamaños de muestra mayores. En nuestro proyecto, los casos se capturaron en forma prospectiva y cuando se pretendió aumentar la muestra con casos retrospectivos la falta de datos actualizados hizo difícil la localización de los sujetos.

Exposición a arsénico como factor de riesgo para cáncer de piel no melanoma.

Uno de los factores químicos que fue de especial interés en este trabajo fue el arsénico, con el fin de definir la asociación y el peso que la exposición actual y la exposición crónica a este metaloide tiene para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma en esta región. Esto, recordemos fue evaluada de dos formas: 1) la determinación de exposición actual a través de los niveles de arsénico total en el agua de las fuentes de abastecimiento para bebida, y los niveles de arsénico total excretado a través de la orina y 2) mediante la estimación de la exposición histórica a arsénico a partir de la historia de residencia de los individuos en estudio de acuerdo al método descrito por Hsueh y col. (Hsueh *et al.*, 1995).

En lo que respecta a exposición a arsénico a través del agua de bebida, la exposición actual no fue significativa, esto es reflejo del hecho de que sólo 3 (8%) casos y 2 (5%) controles tuvieron la concentración de arsénico mayor que 50 µg/l en el agua de bebida, razón por la cual no se obtuvo diferencia significativa entre la población caso y la control. Debe hacerse notar además que de esos 5 pacientes sólo 1 (que correspondió a un caso) tuvo valores de As en orina >100 µg/l y que este paciente reportó que su consumo de agua es 100 % de la fuente de agua analizada. Los otros cuatro reportaron que entre el 27 al 50 % de su consumo de líquidos lo hacen de fuentes diferentes a las que resultaron con valores de arsénico superiores a las recomendadas para agua de bebida (referirse a tabla XIII). Igualmente, de los 6 pacientes (4 casos y 2 controles) que resultaron

con valores de arsénico en orina $>100 \mu\text{g/l}$, sólo para uno se demostró que la fuente de exposición fue a través del agua de bebida de su domicilio. Para los otros 5 pacientes la fuente de exposición al metaloide no fue definida, pero podría sugerirse que esta relacionada con dos posibles fuentes; a) el consumo de cigarrillos (4 de 5 pacientes reportaron el hábito de fumar) y b) el consumo de líquidos contaminados en fuentes diferentes a las de su domicilio (los 5 que tuvieron datos de arsénico en agua por abajo de la norma, reportaron que consumen entre el 17 al 100 % de agua fuera de su domicilio (referirse a Tabla XIII).

Por otro lado, consideramos que la baja proporción de individuos expuestos actualmente a arsénico, se debe al tipo de estudio realizado. Este fue diseñado para captar todos los casos incidentes de cáncer de piel de la Región Lagunera, (incluyendo los casos provenientes de las zonas rurales), ya que todos se canalizan al Hospital de Especialidades del IMSS de la Cd. de Torreón. No obstante, la muestra se constituyó por casos y controles que en su mayoría radican en el área urbana conformada por las ciudades de Torreón, Gómez Palacio y Lerdo. De hecho, el porcentaje de residentes en la zona urbana fue de 85% de los casos y 90% de los controles. Una explicación de esto es que debido a que la muestra de casos está constituida por pacientes de edad avanzada, gran parte de éstos actualmente viven al lado de sus hijos, y estos últimos han emigrado del área rural hacia las ciudades, en búsqueda de mejores oportunidades de vida.

Es importante mencionar en este momento, que los datos que muestran que no existe asociación en el desarrollo de cáncer con respecto a la exposición actual a arsénico, no son inesperados y están de acuerdo a datos obtenidos en relación con diferentes agentes químicos y físicos asociados con el desarrollo de cáncer en general. Recordemos que la exposición actual a un posible carcinógeno, con excepciones, tiene poca relevancia y que se ha propuesto que es la exposición pasada, y en particular la historia de exposición acumulada la que parece tener mayor importancia para el desarrollo de cáncer (ATSDR, 1998). Este, recordemos también, se acepta es la suma un gran número de eventos o accidentes independientes que tienen como resultados la proliferación alterada de células transformadas, y que en general requieren de periodos de latencia largos para expresarse como cáncer.

En apoyo de lo anterior, nosotros encontramos que la exposición en el pasado, en cambio resultó significativamente asociada con el desarrollo de cáncer. De hecho, un 45% de los casos tuvieron historia de exposición alta a arsénico (>25 ppb), comparado con sólo 9% de los controles en el mismo nivel histórico de exposición (alta). El análisis de estos datos indicó que el hecho de contar con una historia personal de exposición a arsénico medio o alto, confirió un riesgo 3.37 veces mayor (OR=4.37 con una $p=0.005$) de desarrollar cáncer de piel entre los niveles de exposición histórica.

Con relación al uso de datos históricos de concentración de arsénico en las poblaciones de residencia de los individuos en estudio para estimar la exposición

pasada a un contaminante como el arsénico, esta es una estrategia aceptada en estudios en donde no existe otra forma de evaluar la exposición (Karagas *et al.* 1998, Ferreccio *et al.* 1998, Lewis *et al.* 1999).

Brevemente, y retomando el análisis de los pacientes que resultaron con niveles de arsénico en agua y en orina por arriba de lo recomendado, (discutido párrafos arriba), es importante notar que dos factores relacionados con exposición histórica (a arsénico y luz solar), estuvieron presentes en los casos como sigue: i) 5 de los 6 pacientes caso, resultaron con exposición histórica alta a arsénico, ii) 4 de 6 casos tuvieron historia de exposición a luz solar importante [nivel 4] y iii) solamente un paciente caso no presentó exposición histórica alta (tuvo exp. media) ni historia de exposición a luz solar (datos presentados en la Tabla XIII de resultados). Esto sugeriría que el papel de la exposición histórica a ambos agentes es el principal responsable del desarrollo de cáncer de piel, y es de menor relevancia la exposición a uno solo de estos agentes, mientras que la influencia de la exposición a arsénico actual no parecería importante. Debe mencionarse que este análisis solamente sería válido, bajo el supuesto que la contribución de otros factores fuese equivalente para todos los pacientes caso y controles comparados.

HLA en cáncer de piel con y sin antecedentes de exposición a arsénico.

Uno de los propósitos en el proyecto, fue evaluar la contribución de los alelos HLA en los individuos expuestos de forma crónica a arsénico *versus* los sujetos no expuestos. Sin embargo, la estratificación de la población de casos y controles, de acuerdo al nivel de exposición histórica a arsénico, que dio como resultado que se

obtuvieran *n* muy pequeñas para cada nivel (datos presentados en la Tabla XIV), hizo imposible el análisis estadístico. Por ello, este objetivo será posible de cumplir cuando se alcance un tamaño de muestra mayor que permita que en cada estrato se ubique el número de pacientes que permitan realizar tal análisis.

No obstante lo anterior, al revisar la distribución de los tres alelos en la población caso y control en los diferentes estratos de exposición histórica a arsénico (Tabla XIV), pudimos observar que los alelos HLA-A11 y HLA-B27 se distribuyeron de manera más equilibrada en la muestra de pacientes caso y pacientes control (Tablas XVI y XVII), frecuencia de distribución que se mantuvo sin una clara tendencia entre los niveles históricos de exposición a arsénico medio y bajo (Tabla XIV y Figura 16).

La distribución que observamos para HLA-DR7 fue diferente. En primer lugar, de los 11 pacientes DR7+, 7 (64 %) fueron caso y solo 4 (36 %) correspondieron a controles (Tabla XV). El análisis de esta distribución, recordemos, dio como resultado una OR de 2.13 pero no fue significativa ($p=0.25$). Al estratificar los datos en los niveles históricos de exposición a arsénico, esta tendencia se mantuvo y claramente la frecuencia de distribución de DR7⁺ fue mayor en los casos, especialmente en aquellos que se ubicaron en el nivel histórico de exposición alto de arsénico --5 de 7 casos DR7⁺ estuvieron en este nivel, lo que representa un 71 % de los casos DR7⁺, y el 13% del total de los casos-- (Tabla XIV y Figura 16). Esto, podría sugerir que los pacientes DR7⁺, cuando tienen historia de exposición a factores de riesgo, en especial a arsénico alto (>25 ppb), además de exposición histórica a luz solar, pertenecen al género que confiere mayor riesgo, y que se encuentren en una etapa de la vida posterior a la quinta

década de vida), tienen mayor probabilidad de desarrollar cáncer de piel de tipo no melanoma (Tabla XV). Esta sugerencia, debemos recalcar se basa solamente en la frecuencia de distribución de los pacientes que resultaron HLA-DR7⁺, sin embargo es necesario hacer una demostración formal de esto.

Otros factores de riesgo para cáncer de piel no melanoma.

El análisis de la información obtenida de la historia de exposición mostró que en la población mestiza mexicana estudiada, los varones presentaron un riesgo once veces mayor (OR= 11.66) de desarrollar cáncer de piel de tipo no melanoma. Esto puede ser atribuido a las diferencias en las actividades laborales realizadas por los varones que favorecían la exposición a la luz. De hecho, cuando se analizó la variable empleos con exposición a luz solar y género se encontró una OR =24.79 con p=0.05, lo cual quiere decir que los hombres tuvieron casi 23.7 veces más empleos con esta característica que las mujeres (Torres Vargas, en preparación). En este sentido, debe recordarse que uno de los factores mejor caracterizados en relación a su potencial carcinogénico en piel es la radiación solar (Streilein ,1996) . Así, el encontrar al género masculino con mayor riesgo para desarrollar cáncer de piel, además de relacionarse con la exposición a radiación solar, también está de acuerdo con los reportes existentes en donde se atribuye a los varones un mayor riesgo de desarrollar cáncer de piel de tipo no melanoma (ASC, 1998). Con relación a esto, se ha sugerido que existe una predisposición especial por género para ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, resultados de un estudio para definir factores de riesgo asociados a cáncer de pulmón, han asociado como factor de

riesgo el genotipo nulo del gene glutation S-transferasa M1 al género femenino (RR=2.50) y en mujeres fumadoras con una RR=2.25 (Tang *et al.* 1998).

También la edad es una variable claramente relacionada con el desarrollo de cáncer en general, ya que desde hace décadas se conoce que el envejecimiento es acompañado por disminución en la capacidad del sistema inmune, lo cual se traduce en un descenso de los niveles séricos de anticuerpos específicos de antígeno como aquellos presentes en vacunas, (Sabin *et al.* 1947, Ershler *et al.* 1984, Grubeck-Loebenstein *et al.* 1998). También se ha documentado disminución en la respuesta de hipersensibilidad retardada, es decir un deterioro en la capacidad inmune que además de modificar la resistencia a infecciones también puede estar relacionado con el aumento en la frecuencia de algunos tipos de cáncer. Con relación a esto último, se ha reportado también que en el cáncer de próstata se asocia claramente a la edad como un factor de riesgo (Ellison *et al.* 1998).

Esto está de acuerdo con nuestros datos que mostraron que el riesgo de desarrollar cáncer de piel aumenta 9 % por cada año que el sujeto envejece (OR= 1.09, p=0.000). A partir de estos resultados, sin embargo, no es posible definir los mecanismos que contribuyen a esta asociación. Un posible mecanismo puede estar relacionado también con la exposición acumulada a la radiación solar. En este estudio, el promedio de horas al día que el sujeto se expone o se expuso a la luz solar (ver Fig. XVIII), también resultó significativamente asociado con la presencia de cáncer de piel no melanoma, pues por cada hora que el sujeto se

expuso al sol, el riesgo de desarrollar cáncer de piel resultó 31 % mayor. Sin embargo como ya se indicó anteriormente para el desarrollo del cáncer de piel, además del promedio de exposición diaria a la luz solar, también resultó importante la exposición que el sujeto acumula durante toda la vida. Estos dos factores además de una potencial disminución de la competencia inmune para defenderse contra las agresiones internas y externas, pueden explicar la asociación de la edad con un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer de piel (Sabin *et al.* 1947, Ershler *et al.* 1984, Grubeck-Loebenstein *et al.* 1998). En este sentido, es importante mencionar que esta posible explicación se sustenta en el hecho de que datos previos han demostrado que la inducción de cáncer de piel por radiación UVB puede deberse al menos a 2 mecanismos: 1) provocando mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores dentro de las células cutáneas, conduciendo eventualmente a la pérdida del control del crecimiento y con esto a una proliferación autónoma (Kevin 1996), o bien 2) produciendo inmunosupresión.

Ahora bien, conociendo la importancia que la exposición a las radiaciones solares tiene para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma, la medida más importante para reducir el riesgo de desarrollar cáncer de piel de tipo no melanoma es reducir las exposiciones a la luz solar y la manera más simple de lograr esto es permanecer en la sombra siempre que sea posible y/o protegerse con ropa de tejido cerrado y usar filtros protectores sobre la piel expuesta cuando sea necesario exponerse al sol (ASC 1998). No obstante la sencillez de estas medidas, sólo se llevan a cabo si el sujeto tiene un nivel de educación y nivel

económico adecuados que le permita estar informado de los riesgos que para la salud representa la exposición a la luz solar, y además que su nivel de educación le permita acceder a empleos en los que no tenga una exposición excesiva a los rayos del sol y / o usar medidas de protección. Con relación a esto es importante mencionar que el análisis bivariado de los datos obtenidos de cuestionario de exposición (ver pie de tabla de Tabla XVIII), mostró que dos variables son importantes en el contexto de la información anterior: el grado escolar y el nivel económico (OR= 0.5 con $p=0.000$, y OR=0.43 con $p=0.011$, respectivamente), que se asociaron como factores de protección para el desarrollo de cáncer de piel. Todas las variables que, de acuerdo al análisis bivariado de nuestros datos, se encontraron que contribuyen como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma, fueron; exposición histórica a arsénico (OR=4.39 $p= 0.005$), edad (OR=1.09 $p= 0.000$), género (OR=11.66 $p= 0.000$), exposición al sol (OR=1.32 $p= 0.010$), grado escolar (OR=0.48, $p=0.000$), nivel económico (OR=0.43 $p= 0.011$), alimentación (OR=0.62, $p=0.010$) y tabaquismo (OR=2.18, $p=0.008$).

Párrafos arriba se discutió el papel de prácticamente todas las variables que resultaron asociadas, como factores de riesgo o de protección para el desarrollo de cáncer de piel. El consumo de tabaco ha sido previamente reportado que causa alteraciones en la inmunidad celular y humoral, y ha sido claramente asociado con el desarrollo de cáncer de pulmón (US Dep. of Health 1989), pero no existen datos previos que apoyan la asociación con cáncer de piel.

Con relación a la alimentación como factor de protección, es importante mencionar que esta variable está vinculada con las diferencias que existieron en las

covariables grado escolar y nivel económico, pues en la medida que los individuos tuvieran un nivel escolar y económico mejor, tendrían una alimentación "más equilibrada", asociándose con menor riesgo. Esto, está de acuerdo con el conocimiento previo de la influencia que la ingesta de micronutrientes tiene sobre la toxicidad y carcinogénesis provocada por químicos, ya que se ha propuesto que éstos (los micronutrientes) interactúan con los metales tóxicos a diferentes niveles (Peraza *et al.*, 1998).

Finalmente, el análisis de la contribución que tuvo cada una de las variables asociadas con el desarrollo de cáncer en nuestra población, demostró que las variables que contribuyen de manera más importante en el desarrollo de cáncer de piel en nuestra población, fueron: edad, género y exposición histórica a arsénico con OR=1.08 (p=0.002), OR=5.69 (p=0.004) y OR=4.27 (p= 0.028), respectivamente.

VIII. CONCLUSIONES

1.- Las frecuencias encontradas para los alelos evaluados en la muestra total analizada fueron:

- Para el alelo HLA-A11 fue de 8 %.
- Para el alelo HLA-B27 fue de 14 %.
- Para el alelo HLA-DR7 fue de 13 %.

2.- Con el tamaño de muestra estudiado no fue posible definir si la presencia de los alelos HLA estudiados predisponen o protegen el desarrollo de lesiones precancerosas y cancerosas. Las OR obtenidas para HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 fueron respectivamente de 0.81, 0.90 y 2.13, pero no fueron estadísticamente significativas.

3.- Con el tamaño de muestra estudiado, no fue posible definir si la presencia de estos alelos de HLA favorece el desarrollo de cáncer de piel cuando el sujeto tiene una historia de exposición a arsénico a través del agua de bebida.

4.- La exposición histórica a arsénico es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, (OR=4.39, $p=0.005$ a partir del análisis categorizado por niveles de exposición).

5.- Los resultados obtenidos permitieron calcular los tamaños de muestra necesarios para evaluar la asociación de estos alelos, con el desarrollo de cáncer de piel no melanoma en la Región de la Laguna. Consideramos que hasta que se alcance dicho tamaño de muestra, será posible definir la utilidad de los alelos estudiados como marcadores de susceptibilidad genética en esta población.

IX. PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas inmediatas que planteamos están las siguientes:

1.- La primera perspectiva, surgida como consecuencia lógica de este estudio piloto, es la continuación del estudio. Esto implica obtener las muestras necesarias para cumplir con el tamaño que calculamos a partir de nuestros datos (ver tabla XIX de esta tesis). Esto, consideramos permitirá definir la asociación de los alelos HLA-A11, HLA-B27 y HLA-DR7 como posibles marcadores de susceptibilidad genética para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma, sin la incertidumbre de que el tamaño de muestra sea una limitante. La factibilidad de alcanzar a mediano plazo el tamaño de muestra calculado, es bueno para HLA-DR7, sin embargo el tamaño de muestra calculado para HLA-A11 y HLA-B27 será posible de alcanzar sólo a largo plazo.

2.- Con base a que previamente ha sido sugerido que la homocigocidad de los alelos HLA contribuye con mayor riesgo para el desarrollo de cáncer (Ong *et al.*, 1999, Dausset *et al.*, 1982, von Fliedner *et al.*, 1980), otra perspectiva del trabajo es estudiar la posible existencia de homocigocidad en los casos y controles que resultaron positivos para los alelos estudiados en este. El alelo que representa mayor interés para nosotros es HLA-DR7.

3.- De manera independiente a los resultados que se obtengan de la evaluación de los alelos HLA-A11, B27 y DR7 (previamente reportados como factores de

protección o riesgo), es pertinente considerar la tipificación del haplotipo completo de los individuos incluidos en la muestra. Esto con el objetivo de buscar otros alelos como posibles indicadores de susceptibilidad diferencial para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma, en la Región en estudio. Independientemente de lo anterior, la tipificación del haplotipo permitiría caracterizar desde el punto de vista de las características genéticas de HLA, la población de la región que hemos seleccionado para el estudio.

4.- Finalmente, y también considerando la ventaja que representa contar con el banco de DNA obtenido a partir de este estudio, es de interés evaluar el polimorfismo del gene p53. Este interés se basa en que estudios preliminares realizados en pacientes inmunosuprimidos con fines de transplante renal, han relacionado una mayor frecuencia del genotipo p53Arg en pacientes que desarrollan cáncer de piel de tipo epidermoide (Storey *et al.*, 1998). Debe mencionarse, que también con relación a los alelos de p53 existen resultados controvertidos obtenidos de estudios con poblaciones de diferentes regiones geográficas (Storey *et al.*, 1998, Helland *et al.*, 1998; Josefsson *et al.*, 1998; Hildesheim *et al.*, 1998). Esta controversia apoya la necesidad de realizar mayores estudios al respecto.

X. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., Lichtman A. H., Pober, J. S. (1997). *Celular and Molecular Immunology*. W. B. Saunders Co. Philadelphia.

Alberts, B., Bray, D., Lewis J., Raff, M., Roberts, K., Watson J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Third ed. Garland Publishing, Inc, New York.

American Society of Cancer. Skin cancer -.Nonmelanoma. Reporte 1998. www2.cancer.org

Ames, B., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2281-2285.

Arnett, K. L., Parham, P. (1995). HLA Class I nucleotide sequences. *Tissue Antigens* **46**, 217-257.

Ashby, J., and Tennant, R.W. (1988). Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutation Res.* **204**,17-115.

ATSDR. (1998). U.S. Toxicological Profile for Arsenic (Update). Department of Health & Human Services.

ATSDR/TP-88/02. (1989). Toxicologic profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry . US Public Health Service & U.S. Environmental Protection Agency (EPA).

Babbitt, B.P., Allen, P.M., Matsueda, G., Haber, E., and Unanue, E.R.,(1985) Binding of immunogenic peptides to 1A histocompatibility molecules. *Nature* **317**, 359-361.

Barr, B. B. B., Benton, E. C., Mc Laren, K., Bunney, M. H., Smith, I. W., Blessing, K., and Hunter, J. A. A. (1989). Human papillomavirus infection and skin cancer in renal allograft recipients. *Lancet* **1**, 124-129.

Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**, 235-248.

Bouwes Bavinck, J. N., Kootte, A. M. M., van der Woude, F. J., Vandenbroucke, J. P., Vermeer, B.J., and Claas, F. H. J. (1990). HLA-A11-associated resistance to skin cancer in renal transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1350.

Bouwes Bavinck, J. N., Kootte, A. M. M., van der Woude, F. J., Vandenbroucke, J. P., Vermeer, B. J., and Claas, F. H. J. (1991a). On a possible protective effect of HLA-A11 against skin cancer and keratotic skin lesions in renal transplant recipients. *J. Invest. Dermatol.* **97**,269.

Bouwes Bavinck, J. N., Vermeer B. J., van der Woude F. J., Vandenbroucke J. P., Schreuder G. M. T., Thorogood J., Persijn G. G., and Claas F. H. J. (1991b). Relation between skin cancer and HLA antigens in renal-transplant recipients. *The New England Journal of Medicine* **325**, 843-848.

Bouwes Bavinck, J. N., Gissman L., Claas F. H. J., Van der Woude, F. J., Persijn G. G., Schegget J. T., Vermeer B. J., Jochmus I., Müller, M., Steger G., Gebert S and Pfister, H. (1993). Relation between skin cancer, humoral responses to human papillomaviruses, and HLA Class II molecules in renal transplant recipients. *The Journal of Immunology* **151**(3), 1579-1586.

Bouwes Bavinck, J. N., and Claas , F. H. J. (1994). The role of HLA molecules in the development of skin cancer. *Human Immunology* **41**, 173-179.

Bouwes Bavinck, J. N., Claas, F. H. J., Hardie, D. R., Green, A., Vermeer, B.J., and Hardie, I. R. (1997). Relation between HLA antigens and skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. *The Journal of Invest. Dermatol.* **108**, No. 2, 708-711.

- Boyle, J., MacKie, R. M., Briggs, J. D., Junor, B. J. R., Aitchinson, T. C. (1984). Cancer, warts, and sunshine in renal transplant patients: a case-control study. *Lancet* **1**, 702-705.
- Brown, K. G., and Chen, C.J. (1995). Significance of exposure assessment to analysis of cancer risk from inorganic arsenic in drinking water in Taiwan. *Risk Anal.* **15**, 475-484.
- Brugge, J., Curran, T., Harlow, E., McCormick, F., eds. (1991). *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Buchet, J.P., and Lauwerys, R. (1985). Study of inorganic arsenic methylation by rat liver *in vitro* : relevance for the interpretation of observation in man. *Arch. Toxicol.* **57**, 5125-5129.
- Burns, L. A., Levier, G. D., and Munson, A. E. (1994) Immunotoxicology of arsenic in *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. Dean J. H., Luster, M., Munson A. E., and Kimber I (editors), Second ed., Raven Press, New York.
- Cavigelli, M., Li, W. W., Lin, A., Su, B. Yoshioka K., and Karin M. (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *The EMBO Journal* **15** (22), 6269-6279.
- Cebrián, M. E., Albores, A., Aguilar, M., and Blakely, E. (1983). Chronic arsenic poisoning in the North of Mexico. *Human Toxicol.* **2**, 121-133.
- Ceremile, D., Contu, L., Carcassi L et al. (1988). HLA and multiple skin carcinomas. *Dermatologica* **176**, 176-181.
- Cox, D. H. (1980). Arsine evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination of nanogram levels of total arsenic in urine and water. *J. Anal. Tox.* **4**, 207-211.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. (1989) Neoplasia. In *Pathologic basis of disease*, pp. 239-305. 4th ed: WB Saunders, Philadelphia.
- Cullen, W. R., McBride, B. C., and Reglinski, J. (1984). The reaction of methylarsenicals with dithiols. Some biological implications. *J. Inorg. Bioch.* **21**, 179-194.
- Cuzick, J., Evans, S., Gillman, M., and Price Evans, D. A. (1982). Medicinal arsenic and internal malignancies. *Br. J. Cancer* **45**, 904-911.
- Czarnecki, D., Lewis, A., Nicholson, I. and Tait B. (1991a). Multiple non melanoma skin cancer associated with HLA-DR7 in southern Australia. *Cancer* **68**, 439-440.
- Czarnecki, D., Lewis, A., Nicholson, I., and Tait, B. (1991b). Multiple basal cell carcinomas and HLA frequencies in southern Australia. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 559.
- Czarnecki, D., Lewis, A., Nicholson, I., and Tait, B. (1992a). HLA-DR1 is not a sign of poor prognosis for the development of multiple basal cell carcinomas. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 717.
- Czarnecki, D., Zalcberg, J., Nicholson, I., and Tait, B. (1992b). Skin cancer and HLA antigens. *N. Engl. J. Med.* **326**, 765.
- Czarnecki, D., Watkins, F., Leahy, S., Dyll-Smith, D., Lewis, A., Nicholson I., and Tait, B. (1992c). Skin cancers and HLA frequencies in renal transplant recipients. *Dermatology* **185**, 9-11.
- Czarnecki, D., Nicholson, I., Tait, B., and Nash, C. (1993). HLA-DR4 is associated with the development of multiple basal cell carcinomas and malignant melanoma. *Dermatology* **187**, 16-18.

- Czarnecki, D., Tait, B., Lewis, A., et al. (1994). Multiple non-melanoma skin cancer: evidence that different MHC genes are associated with different cancers. *Dermatology* **188**, 188-190.
- Challenger, F. (1945). Biological methylation. *Chem. Rev.* **36**, 315-361.
- Chen, Y. J., Chuang, Y. C., Lin, T. M., and Wu, H. Y. (1985). Malignant neoplasm among residents of a blackfoot disease-endemic area of Taiwan: high-arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res.* **45**, 5895-5899.
- Dausset, J., Colombani, J., and Hors J. (1982). Major histocompatibility complex and cancer, with special reference to human familiar tumors (Hodgkin's disease and other malignancies). *Cancer Surv.* **1**, 119-147.
- Del Razo, L. M., Garcia-Vargas, G. G., Albores, A., Gonsebatt M. E., Montero, R., Ostrosky-Wegman, P., Kelsh, M., and Cebrian M. E. (1997). Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Arch. Toxicol.* **71**, 211-217.
- Doll, R. and Peto, R. (1987) Epidemiology of cancer. In *Oxford Textbook of Medicine*. (D. J. Weatherall, J.G.G. Ledingham, D. A. Warrell, eds.), 2nd ed., pp 4.95-4.123. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dominguez, O., Coto, E., Martinez-Naves, E., Choo, S.Y., and López-Larrea, C. (1992). Molecular typing of HLA-B27 alleles. *Immunogenetics* **36**, 277-282.
- Ellison, L. F., Stokes, J., Gibbons, L., Lindsay, J., Levy, I., and Morrison, H. (1998). Monograph series on aging-related diseases: X. Prostate cancer. *Chronic Dis. Can.* **19**(1), 1-18.
- Elmets, C. A., Borgstresser, P. R., Tigelaar, P.J., Wood, P.J., and Streilein J. W. (1983). Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* **158**, 781-794.
- Ershler, W. B., Moore, A. L., and Socinski, M. A. (1984). Influenza and aging: Age-related changes and the effects of thymosin on the body response to influenza vaccine. *J. Clin. Immunol* **4**, 445-454.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model of colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.
- Ferreccio, C., Gonzalez Psych, C., Milosavjevic Stat, V., Marshall Gredis, G., Sancha, A. M. (1998). Lung cancer and arsenic exposure in drinking water: a case-control study in northern Chile. *Cad. Saude Publica* **14** Suppl 3, 193-198.
- Germolec, D. R., Yoshida, T., Gaido, K., Wilmer J. L. Simeonova, P. P, Kayama F., Bureson F., Dong, W., Lange R. W., and Luster M. I. (1996). Arsenic inducer overexpression of growth factors in human keratinocyte. *Toxicol. Applied Pharmacol.* **14** (1), 308-318.
- Germolec, D.R., Spalding, J., et al. (1997). Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mut. Res.* **386**, 209-218.
- Glover, M. T., Bodmer, J., Kennedy, L. J., Brown, J., Navarrete, C., Kwan, J. T. C., and Leigh, I. M. (1993). HLA antigen frequencies in renal transplant recipients and non-immunosuppressed patients with non-melanoma skin cancer. *Eur. J. Cancer* **29A**, 520.
- Gonsebatt, M. E., Vega, L., Herrera, L. A., Montero, R., Rojas, E., Cebrian, M. E., and Ostrosky-Wegman P. (1992). Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mut. Res.* **283**, 91-95.
- Gonsebatt, M. E., Vega, L., Montero, R., Garcia-Vargas, G. G., Del Razo, L. M., Albores, A., Cebrian, M. E., and Ostrosky-Wegman P. (1994). Lymphocyte replicating habiility in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mut. Res.* **313**, 293-299.

- Goodfellow, P.N., Jones, E. A., Van Heyningen, V., Solomon, E., Bobrow, M., Miggiano, V and Bodmer, W. F. (1975). The $\alpha 2$ -microglobuline gene is on chromosome 15 and not in the HLA region. *Nature* **254**, 267-269.
- Gorodezki, C. (1996). Departamento de Inmunogenética INDRE. Manual de técnicas del XI Curso Teórico-Práctico de Genética Molecular.
- Grubeck-Loebenstien, B., Berger, P., Saurwein-Teissl, M., Zisterer, K., and Wick, G. (1998). No immunity for the elderly. *Nature Medicine*, **4**(8), 870.
- Guardiola J. and Maffei, A. (1993). Control of MHC class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *Critical Reviews in Immunology* **13** (3/4), 247-268.
- Haber, D. A., Housman, D. E. (1991). Rate limiting steps: the genetics of pediatric cancers. *Cell* **64**, 5-8.
- Hansen, T.H., Carreno, B. M., and Sachs, D. H. (1993) The Major Histocompatibility Complex. In *Fundamental Immunology*, (edited by William E. Paul), Third Ed., pp.577-628, Raven Press Ltd, New York.
- Harnden, D.G. (1990), The molecular basis for inherited susceptibility to and action of carcinogens, In *Basic Sciences in Toxicology, Proceeding from V International Congress of Toxicology*, Volans G.N., Sims, J., Sullivan, F.M. Turner, P. (eds). Taylor & Francis, Brighton, Engl. pp. 7-11.
- Harris, H. (1986) The genetic analysis of malignancy. *J. Cell. Sci.* **4** (Suppl.), 431-444.
- Hartevelt, M. M., Bouwes Bavinck, J. N., Kootte, A. M. M., Vermeer, B.J., and Vandembroucke, J. P. (1990). The incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation* **49**, 506-509.
- Helland, A., Langerod, A., Johnsen, H., Olsen A. O., Skovlund E., and Borresen-Dale, A. (1998).). Scientific correspondence. *Nature* **396**, 531.
- Hildesheim, A., Schiffman, M., Brinton L. A., Fraumeni Jr J. F., Herrero, Bratti, M. C., Schwartz, P., Mortel, R., Barnes, W., Greenberg, M., McGowan, L., Scott, D. R., Martin, M., Herrera J. E., and Carrington, M. (1998).). Scientific correspondence. *Nature* **396**, 532.
- Hsueh, Y. M., Cheng, G. S., Wu, M. M., Yu, H. S., Kuo, T. L. and Chen, C. J. (1995). Multiple risk factors associated with arsenic-induced skin cancer: effects of chronic liver disease and malnutritional status. *British Journal of Cancer* **71**, 109-114.
- IARC (1980). International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 23. Some metals and metallic compounds. Lyon, 99.39-141.
- Janeway, Charles and Travers, Paul. (1996). *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing Inc. New York & London.
- Josefsson A. M., Manusson P. K. E., Ylitalo, N., Quartforth-Tubbin, P., Pontén, J., Adami H. O., and Gyllensten U. B. (1998). Scientific correspondence. *Nature* **396**, 531.
- Karagas, M. R., Tosteson, T.D., Blum, J., Morris, J.S., Baron, J.A., and Klaue, B. (1998). Design of an epidemiologic study of drinking water arsenic exposure and skin and bladder cancer risk in a U.S. population. *Environ. Health Perspect.* **106** Suppl. 4, 1047-1050.
- Kevin, D. Cooper. (1996). Cell-mediated immunosuppressive mechanisms induced by UV radiation. *Photochemistry and Photobiology* **63**(4), 400-405.

- Klaus, G. G. B. (1987). *Lymphocytes, a practical approach*. Editorial Iripres. National Institute for Medical Research.
- Knudson A. G. (1985) Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.* **45**, 1437-1443.
- Krausa, P., and Browning, M. J. (1996). A comprehensive PCR-SSP typing system for identification of HLA-A locus alleles. *Tissue Ant* **47**, 237-244.
- Krausa, P., Bodmer, Julia G., and Browning, Michael J. (1993). Defying the common subtypes of HLA A9, A10, A28 y A19 by use of ARMS/PCR. *Tissue Ant.* **42**, 91-99.
- Kurimoto, I., and Streilein, J. W. (1994). Characterization of the immunogenetic basis of ultraviolet-B light effects on CH induction. *Immunology* **81**, 352-358.
- Kwok, W. W., and Nepom, G.T. (1998). Genetic influences: Major Histocompatibility Complex. In *The Autoimmune Diseases*. Edited by Noel R Rose and Ian R Mackay. Third edition. Academic Press. London.
- Lee, Jeffrey E., Reveille, J. D., Ross, Merrick I., and Platsoucas, C. D. (1994). HLA-DQB1*0301 association with increased cutaneous melanoma risk. *Int. J. Cancer* **59**, 510-513.
- Le Poole, C., Mutis, T., van den Wijngaard, R. M. J. G. J., et al. (1993). A novel antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J. Immunol.* **15**, 7284-7292.
- Lewis, D. R., Southwick, J. W., Ouellet-Hellstrom, R., Rench, J., Calderon, R. L. (1999). Drinking water arsenic in Utah: A cohort mortality study. *Environ. Health Perspect* **107**(5), 359-365.
- Li, J. H., and Rossman, T. G. (1991). Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in chinese hamster V79 cells. *Biol. Met.* **4** (4), 197-200.
- Lulli, P., Grammatico, P., Brioli, G., Catricalá, C., Morellini, M., Roccella, M., Mariani, B., Pennesi, G., Roccella, F., Cappellacci, S., and Trabace, S. (1998). HLA-DR and -DQ alleles in Italian patients with melanoma. *Tissue Ant.* **51**, 276-280.
- Marcus, W. L., and Rispin, A. S. (1988). Treshold carcinogenicity using arsenic as an example. In *Advances in modern environmental toxicology*, Vol. 15. *Risk assessment and risk management of industrial and environmental chemicals*, (edited by M.A. Mehlman), pp- 133-158. Princeton Scientific, Princeton, N. J.
- Marincola, F. M., Venzon, D., White, D. et al. (1992). HLA association with response and toxicity in melanoma patients treated with interleukin 2-based immunotherapy. *Cancer Res.* **52**, 6561-6566.
- Marsh, S. G. E., Bodmer, J. G. (1995). HLA Class II region nucleotide sequences. *Tissue Antigens* **46**, 258-280.
- Mass, J. M., and Wang, L. (1997). Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mut. Res.* **386**, 263-277.
- Maurer, T. A., Christian, K. V., Kerschmann, R.L., Berzin, B., Palefsky, J. M., Payne, D., Tyring, S. K., and Berger, T. G. (1997). Cutaneous squamous cell carcinoma in human Immunodeficiency virus-infected patients. *Arch. Dermatol.* **133**, 577-583.
- Mc Gregor J. M., Reddi, G., MacDonald D, Vaughan R. W., Welsh K. I. (1992). HLA-A11 in renal allograft recipients with skin cancer. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 261.

- McGee, J.O'D., Issacson, P. G., Wright, N.A., eds. (1992). *Textbook of Pathology*. Vol 1, pp. 569-717, Oxford University Press, Oxford, UK.
- McMichael, A. J. and Bodmer, W. F (editors). A New Look at Tumour Immunology. (1992). *Cancer Surveys*, vol 13. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
- Mukhtar, H and Elmetts C. A. (1996). Photocarcinogenesis: mechanisms, models and human health implications. Introduction. *Photochem. Photobiol.* **63** (4), 355-447.
- Muto, M., Ohmura, A., Nakano, J. et al. (1996). HLA class I polymorphism and the susceptibility to malignant melanoma. *Tissue Ant.* **47**, 447-449.
- Myskowski, P. L., Pollack, M. S., Schorr, E., Dupont, B., and Safai, B. (1985). Human leukocyte associations in basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **12**, 997-1000.
- Nordberg, G. F., and Andersen, O. (1981). Metal interactions in carcinogenesis: enhancement, inhibition. *Environ. Health Perspect.* **40**, 65-81.
- Nowell, P. C. (1986). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* **46**, 2203-2207.
- Okui, Y., and Fujiwara, Y. (1986). Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the comutagenic effect in V79 chinese hamster cells. *Mut. Res.* **172**, 69-76.
- Ong, C. S., Keogh, A. M., Kossard, S., Macdonald, P. S, Spratt P.M. (1999) Skin cancer in Australian heart transplant recipients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **40**(1), 27-34.
- Orkin, M., Maibach, H. I., Dahl, M.V..(1994). *Dermatología*. Editorial El Manual Moderno, México.
- Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME, Montero R., Vega, L., Barba, H., Espinoza, J., Palao, A., Cortinas, C., Garcia Vargas, G. G., del Razo, L. M. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mut Res* **250**, 477-482.
- Pardoll, D. M. (1993). Cancer Vaccines. *Immunology Today*, **14**: 310-316.
- Parkin, D. M., Laara, E., Muir, C.S. (1988). Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int. J. Cancer* **41**, 184-197.
- Peraza, M.A., Ayala-Fierro, F., Barber, D. S., Casarez, E., Rael, L.T. (1998). Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ. Health Perspect.* **106**, Suppl 1, 203-216
- Pershagen, G. (1981). The carcinogenicity of arsenic. *Environ. Health. Perspect.* **40**, 93-100.
- Robbins, S. L., Cotran, R. S., Kumar, V. (1989). *Pathologic Basis of Disease*, pp. 239-305. Saunders, Philadelphia.
- Rosales Castillo, J. A. Virus del papiloma humano y exposición crónica a arsénico como factores de riesgo en el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma. Tesis de Maestría en Ciencias (Especialidad en Toxicología), Departamento de Farmacología y Toxicología. Sección de Toxicología Ambiental. CINVESTAV-IPN. (en preparación).
- Rose, N.R., and Mackay I.R. (1998). Prelude in *The Autoimmune Diseases*. (Edited by Noel R. Rose & Ian R. Mackay), pp. 1-3. Third edition. Academic Press. London.
- Rossmann, T. G. (1981). Enhancement of UV-mutagenesis by low concentrations of arsenite in *E. coli*. *Mut. Res.* **91**, 207-211.

- Rupinder, K. Bhamra, and Max Costa. (1992). Trace elements. Aluminum, Arsenic, Cadmium, Mercury, and Nickel. In *Environmental Toxicants. Human Exposures and Their Health Effects*, (1992), pp. 581-587. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Sabin, A. B., Ginder, D. R., Matumoto, M., *et al* (1947). Serological response of Japanese children to Japanese B encephalitis mouse brain vaccine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **65**, 135-140.
- Salazar, A. M., Ostrosky Wegman P., Menendez, D., Miranda, E., Garcia-Carranca, A., and Rojas, E. (1997). Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mut. Res.* **381**, 259-265.
- Schaumloffel, N., and Gebel, T. (1998). Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. *Mutagenesis* **13**(3), 281-286.
- Schreiber, H. (1993). Tumor Immunology. In *Fundamental Immunology*, (edited by William E. Paul), pp. 1143-1178. Third ed., Raven Press, Ltd., New York.
- Seljelid, R. (1997) Tumour Immunology: Alternative Perspectives. *Scand. J. Immunol.* **46**, 437-444.
- Sikorski, E. E., Burns, L. A., McCoy, K. L., Stern, M. and Munson, A. E. (1991a) . Suppression of splenic accessory cell function in mice exposed to gallium arsenide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **110**, 143-156.
- Sikorski, E. E., Burns, L. A., Stern, M. L., Luster, M. I., and Munson, A. E. (1991b) Splenic cell targets in gallium arsenide-induced suppression of the primary antibody response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **110**, 129-142.
- Solomon, E., Borrow, J., Goddard, A. D. (1991). Chromosome aberrations and cancer. *Science* **254**, 1153-1160.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer J., Leigh, I.M., Matlashewski, G., and Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**, 229-234.
- Streilein, J. W. (1996). Immunogenetics of sunlight-induced skin cancer. *Photochemistry and Photobiology* **63**(4), 422-424.
- Streilein, J. W., and Bergstresser, P. (1988). Genetic basis of ultraviolet-B effects on contact hypersensitivity. *Immunogenetics* **27**, 252-258.
- Tamaki, K., Fujiwara, H., and Katz, S. I. (1981). The role of epidermal cells in the induction and suppression of contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **76**, 275-278.
- Tang, D. L., Rundle, A., Warburton, D., Santella, R. M., Tsai, W. Y., Chiamprasert, S., Hsu, Y. Z., Perera, F. P. (1998). Associations between both genetic and environmental biomarkers and lung cancer: evidence of a greater risk of lung cancer in women smokers. *Carcinogenesis* **19** (11), 1949-1953.
- Thompson, D. J. (1993). A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem. Biol. Interact.* **88**, 89-114.
- Toews, G. P., and Bergstresser, P. (1980). Epidermal Langerhans cell density determines whether contact sensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNCB. *J. Immunol.* **124**, 445-453.
- Torres Vargas R. Estudio de casos y controles para evaluar los factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer de piel en una población de la Región Lagunera. Tesis de Maestría en Salud Pública. Universidad Juárez del Estado de Durango. (en preparación).

- Townsend, A. R. M., Tothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G. Wraith, D., McMichael, A. J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by CTL can be defined with short synthetic peptides. *Cell* **44**, 959-968.
- USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency). (1988): Office of Health and Environmental Assessment. Special Report on Ingested Inorganic Arsenic: Skin Cancer; Nutritional Essentiality. U.S: Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA/625/3-87/013.
- U.S. Department of Health and Human Services (1989). A report of the Surgeon General. Reducing the health consequences of smoking, 25 years of progress. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Vahter, M., and Marafante, E. (1987). Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation on arsenite in the rabbit. *Toxicol. Lett.* **37**, 41-46.
- Vahter, M. (1994). Species differences in the metabolism of arsenic. In *Arsenic exposure and health*. Science Reviews 40 (Chapell, W. R., Abernathy, C. O., Cothorn, C. R. editors) pp. 171-179, UK.
- Varmus, H., and Weinberg, R. A. (1993). *Genes and the Biology of Cancer*. Scientific American Library, New York.
- Vermeer, M., Schmieder, S., van der Verg, J. W., Taylor, J. R. and Streilein, J. W. (1991). Effects of ultraviolet B light on cutaneous immune responses in humans with deeply pigmented skin. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 729-734.
- Vincek, V., Kurimoto, I., Medema, J. P., Priolo, E., and Streilein, J. W. (1993). TNF α polymorphism correlates with deleterious effects of ultraviolet B light on cutaneous immunity. *Cancer Res.* **53**, 728-732.
- Vitasa, B. J., Taylor, H. R., Strickland, P. T., Rosenthal, F.S., West, S., Abbey H, Ket Ng, S., Muñoz, B., and Emmett, E. A. (1990). Association of nonmelanoma skin cancer and actinic keratosis with cumulative solar ultraviolet exposure in Maryland watermen. *Cancer* **65**, 2811-2817.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**, 138-141.
- Von Flidner, V. E., Sultan-Khan, Z., Jeannet, M. (1980). HLA-DRw antigens associated with acute leukemia. *Tissue Antigens* **16**, 399-404.
- Weinberg, R. A. (1988). Finding the anticoncogene. *Sci. Am.* **259** (3), 34-41.
- Weinberg, R. A. (1990). The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 199-202.
- Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* **254**, 1138-1146.
- WHO Nomenclature Committee (1992). Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Immunogenetics* **36**, 135.
- Yamauchi, H., Fowler, B. (1994). Toxicity and Metabolism of Inorganic and Methylated Arsenicals. In *Arsenic in the Environment Part II: Human Health and Ecosystem Effects* (Nriagu JO editors), pp. 35-53. John Wiley & Sons, New York.
- Yang, J. L., Chen, M. F., et al. (1992). Posttreatment with sodium arsenite alters the mutational spectrum induced by ultraviolet light irradiation in chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **20** (3), 156.
- Yeh, S. (1973). Skin cancer in chronic arsenicalism. *Hum. Pathol.* **4**, 469-485.
- Yoshikawa, T., Rae, V., Bruins-Slot, W., van der Berg, J. W., Taylor, R. and Streilein, J. W. (1990).

Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in man. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 530-536.

Zetterquist, Henry and Olerup, Olle. (1992). Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum. Immunol.* **34**, 64-74.

Zhao, C. Q. , Young, M.R., Diwan, B. A., Coogan, T. P., and Waalkes, M. P. (1997). Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 10907-10912.