

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
Asociación de las variantes genéticas Ser734Ala y Arg1980Trp del gen
Tiroglobulina (TG) con el riesgo en el desarrollo y progresión de cáncer tiroideo
bien diferenciado en muestras de pacientes diagnosticados de SOLCA Núcleo
de Quito.

AUTORA:
NATALIA CAROLINA PERALTA VALLEJO

DIRECTORA:
VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, mayo del 2015

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL
TRABAJO DE GRADO**

Autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaro que los conceptos desarrollados, análisis realizados y conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, mayo del 2015

(f) _____

Natalia Carolina Peralta Vallejo.

CI: 1720089760

DEDICATORIA

A mis padres por el amor y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a mi familia por todo su amor incondicional, por sus consejos y motivarme a buscar siempre nuevos retos. En especial a mi madre y padre gracias por todo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas por su confianza y permitirme realizar este estudio en su institución, en especial al Dr. César Paz y Miño, la Dra. Paola Leone y al Ms. Germán Burgos, por compartir sus conocimientos durante el desarrollo de este proyecto.

Al Hospital Oncológico Solón Espinoza Ayala (SOLCA), por su disponibilidad a participar en el estudio aportando las muestras, al departamento de patología y a todo el personal por su noble misión de luchar en contra del cáncer.

A mi tutora Msc. Viviana Chiluisa Utreras, por su ayuda y consejos en la realización de esta tesis y muy especialmente a Jefferson por todo el cariño y motivación a lo largo del camino.

Y claro agradecer a Dios por darme tantas bendiciones en mi vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO 1	1
ANTECEDENTES.....	1
1.1. Tema	1
1.2. Hipótesis	1
1.2.1. Hipótesis alterna.....	1
1.2.2. Hipótesis nula.....	1
1.3. Objetivo	2
1.3.1. General.....	2
1.4. Justificación	3
CAPÍTULO 2	4
LA GLÁNDULA TIROIDES.....	4
2.1. Generalidades de la tiroides	4
2.1.1. Hormonas tiroideas	5
2.1.2. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas.....	6
2.1.3. Patologías de la tiroides	7
2.2. Cáncer de tiroides	8
2.2.1. Generalidades.....	8
2.2.2. Cáncer diferenciado	9
2.2.2.1. Cáncer folicular.....	9
2.2.2.2. Cáncer papilar	10
2.2.3. Factores de riesgo en el Cáncer de Tiroides	10
2.2.3.1. Radiación	10
2.2.3.2. Consumo de yodo	11
2.2.3.3. Sustancias químicas	11
2.2.3.4. Factores genéticos.....	11
2.2.3.5. Factores hormonales	12
2.2.3.6. Ingesta de tabaco y alcohol	13
2.2.3.7. Afecciones benignas previas.....	13

2.2.4.	Factores pronóstico	13
2.3.	Marcadores de susceptibilidad	14
2.3.1.	Genes Relacionados con la síntesis de hormonas	15
2.3.2.	Gen Tiroglobulina (TG).....	16
2.3.2.2.	Polimorfismo Arg 1980 Trp.....	18
2.4.	Técnicas moleculares para detección de marcadores de susceptibilidad	18
2.4.1.	Extracción y cuantificación.....	19
2.4.1.1.	Extracción de ácidos nucleicos	19
2.4.1.2.	Cuantificación de ácidos nucleicos	20
2.4.2.	Técnica de PCR.....	21
2.4.2.1.	Generalidades de la PCR	21
2.4.2.2.	Marcadores moleculares	23
2.4.2.3.	PCR-RFLP	23
CAPÍTULO 3		25
MATERIALES Y MÉTODOS		25
3.1.	Obtención de muestras	25
3.2.	Extracción y purificación de ADN.....	25
3.2.1.	Extracción de ADN a partir de muestras embebidas en Parafina Pure Link TM Genomic ADN Kits de invitrogenTM.....	25
3.2.2.	Extracción de ADN a partir de muestras de Tejido Tumoral Fresco Pure Link TM Genomic ADN Kits de invitrogenTM.....	26
3.2.3.	Análisis cualitativo y cuantitativo.....	27
3.3.	Determinación del genotipo	29
3.3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
3.3.1.1.	Especificación de cebadores	29
3.3.2.	Amplificación del exón 10.....	29
3.3.3.	Amplificación del exón 33.....	31
3.3.4.	Digestión del amplicón de la región de interés del exón 10	32
3.1.1.	Digestión del amplicón de la región de interés del exón 33	33
3.2.	Análisis de datos	34
3.2.1.	Chi- cuadrado	35
3.2.2.	Odds Ratio	36

CAPÍTULO 4.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1. Edad y Sexo	37
4.2. Consumo de alcohol.....	38
4.3. Consumo de tabaco	39
4.4. Extracción de ADN.....	40
4.5. Determinación del genotipo	42
4.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa.....	42
4.5.1.1. Amplificación del exón 10.....	42
4.5.1.2. Amplificación exón 33.....	43
4.5.2. Digestión con enzimas de restricción.....	44
4.5.2.1. Digestión del amplicón del exón 10.....	44
4.5.2.2. Digestión del amplicón del exón 33.....	45
4.6. Frecuencia de alelos	47
4.6.1. Polimorfismo Ser734Ala	48
4.6.2. Polimorfismo Arg1980Trp.....	49
4.6.3. Análisis estadístico.....	50
4.6.4.1. Género.....	52
4.6.4.2. Edad	54
4.6.4.3. Consumo de alcohol y tabaco	54
4.6.4.4. Asociación estratificado por tipo de cáncer	56
Conclusiones	59
Recomendaciones	61
Lista de referencias	62
Anexos	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Carta de autorización por parte de solca núcleo de quito para tomar las muestras biológicas.....	67
Anexo 2. Carta de certificación de la realización del estudio en el instituto de investigaciones biomédicas.....	68
Anexo 3. Consentimiento informado – información al paciente.	69
Anexo 4. Resultados de los genotipos para el exón 10.	70
Anexo 5. Resultados de los genotipos para el exón 33.	73
Anexo 6. Kit de extracción de adn	76
Anexo 7. Técnica de extracción de adn	76
Anexo 8. Muestra de tumor de tiroides fresca	77
Anexo 9. Bloques de parafina de tumores de tiroides.....	77
Anexo 10. Técnica de PCR.....	78
Anexo 11. Elaboración de electroforesis en gel de agarosa.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 14 snp's del gen tiroglobulina (TG).....	17
Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de interés del gen de tiroglobulina (TG).....	29
Tabla 3. Reactivos y concentraciones para amplificar el polimorfismo Ser734Ala del gen TG	30
Tabla 4. Programa de amplificación del polimorfismo Ser734Ala, gen TG.	30
Tabla 5. Reactivos y concentraciones para amplificar el polimorfismo Arg1980Trp del gen TG	31
Tabla 6. Programa de amplificación del polimorfismo Arg1980Trp del gen TG.....	32
Tabla 7. Concentración y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón 10	33
Tabla 8. Estadística descriptiva de los polimorfismos Ser734Ala.....	48
Tabla 9. Estadística descriptiva del polimorfismo Arg1980Trp.....	49
Tabla 10. Análisis de chi- cuadrado para los grupos estudiados para cada polimorfismo	50
Tabla 11. Análisis de los genotipos observados para cada polimorfismo	51
Tabla 12. Análisis estadístico, estratificado por género, para los grupos en estudio con el cáncer de tiroides.	53
Tabla 13. Análisis estadístico, estratificado por género, para los grupos en estudio con el cáncer de tiroides.	54
Tabla 14. Análisis estadístico, estratificado por consumo de alcohol, para los grupos en estudio con el cáncer de tiroides.....	55

Tabla 15. Análisis estadístico, estratificado por consumo de cigarrillo, para los grupos en estudio con el cáncer de tiroides.....	56
Tabla 16. Estudio de la asociación de las variantes genéticas del gen tg, estratificado por tipo de cáncer	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización anatómica de la glándula tiroidea.....	5
Figura 2. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas	7
Figura 3. Th, Nis, TPO y TSHR, que participan en la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas T3 y T4.....	15
Figura 4. Gen TG localizado en la región 8q24	16
Figura 5. Esquema de reacción en cadena de la polimerasa.	22
Figura 6. Secuencia de reconocimiento de la enzima	32
Figura 7. Secuencia de reconocimiento de la enzima.	33
Figura 8. Fórmula para cálculo de (χ^2).....	35
Figura 9. Tabla en estudio de casos y controles por or	36
Figura 10. Frecuencia de edad en casos y controles	37
Figura 11. Frecuencia por género en casos y controles	38
Figura 12. Frecuencia del consumo de alcohol e casos y controles.....	39
Figura 13. Frecuencia del consumo de tabaco en casos y controles	40
Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de adn genómico de muestras embebidas en parafina...40	40
Figura 15. Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de adn genómico de muestra tumoral fresca.41	41
Figura 16. Fotografía en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 10 con una banda de 376pb.43	43
Figura 17. Fotografía en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 33 con una banda de 324pb	44
Figura 18. Fotografía de un gel de agarosa al 4%, teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con blp i, del producto de pcr del exón 10. en el carril 1 se observa el genotipo ser/ala, en el carril 2 el genotipo ala/ala en el carril 3 el genotipo ser/ser	45
Figura 19. Fotografía de un gel de agarosa al 4%, teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con hpy 99i, del producto de pcr del exón 33. en el carril 1 se observa el genotipo arg/trp y en el carril 18 el genotipo trp/trp.46	46

RESUMEN

El carcinoma de tiroides es una de las patologías con más frecuencia dentro de la población ecuatoriana, esta patología ha ido aumentando a través de los años. El cáncer es una enfermedad multifactorial, dentro de esto está el factor genético podría ser un factor determinante. Es por esto que en este estudio se busca asociar las variantes genéticas Ser734Ala y Arg1980Trp con el riesgo en el desarrollo y progresión de cáncer bien diferenciado en muestras de pacientes con cáncer de tiroides de SOLCA Núcleo de Quito.

Se realizó un ensayo caso- control de 50 pacientes de SOLCA y 50 voluntarios de población mestiza ecuatoriana, utilizando muestras biológicas en parafinas y biopsias de tumor fresco de tiroides en el caso de pacientes y para el grupo control se utilizó sangre periférica. Se estudió los polimorfismos de los exones 10 y 33 del gen de la tiroglobulina (Tg) mediante la amplificación y posterior digestión con enzimas de restricción. Además se asocia la presencia de las variantes genéticas del gen TG con las características patológicas del cáncer tiroideo, junto con la modulación de los factores ambientales sobre la enfermedad.

Como resultado del estudio se encontró que las proporciones de los genotipos en el polimorfismo del exón 10 fueron: 9% homocigotos normales (Ser/Ser), 33% homocigotos variantes (Ala/Ala) y 58% heterocigotos (Ser/Ala). Las proporciones de los genotipos encontrados en el polimorfismo del exón 33 son: 18% homocigotos variantes (Arg/Arg) y 82% heterocigotos (Arg/Trp). Los resultados obtenidos a través de la prueba estadística de Chi cuadrado, muestran que no existe asociación entre las variantes genética del gen tiroglobulina con el cáncer de tiroides. Entre los factores ambientales que modulan esta patología, el sexo y el consumo de alcohol no están asociados a la enfermedad, por el contrario la edad y el consumo de tabaco si presentan asociación con la incidencia del cáncer de tiroides.

Palabras Clave: Cáncer de Tiroides, Variantes Genéticas, Tiroglobulina (Tg), genotipo, asociación, PCR, RLFP's

ABSTRACT

Thyroid carcinoma is one of the most frequent diseases within the Ecuadorian population regarding cancer; and this statistic has been increasing over the years, is known that cancer is a multifactorial disease, genetic influence is of them. This is why this study seeks to associate genetic variants Ser734Ala and Arg1980Trp with the development and progression of cancer well differentiated in patients with cancer of thyroid in SOLCA Nucleo de Quito.

A trial was conducted for this case-control of 50 patients of SOLCA and 50 volunteers from Ecuadorian mestizo population, using biological samples in paraffin and biopsies from fresh tumor of thyroid patients and for the control group used peripheral blood, in order to study the exons 10 and 33 of the gene thyroglobulin (Tg), using amplification technique and after a digestion with restriction enzymes.

The presence of the genetic variants of the gene TG, with pathologic features of thyroid cancer is also associated with the modulation of the environment factors of diseases.

The proportions of the genotypes found in exon 10 polymorphism are: 9% normal homozygotes (Ser/Ser), 33% homozygous variants (Ala/Ala) and 58% heterozygous (Ser/Ala). The proportions are found in genotypes polymorphism of exon 33 are: 18% homozygous variants (Arg / Arg) and 82% heterozygotes. The results obtained through statistical Chi square test show not association between genetic variants of thyroglobulin gene in thyroid cancer. Among the environmental factors that modulate disease, sex and alcohol consumption is not associated with the disease, on the contrary age and consumption of snuff if present association with the incidence of thyroid cancer.

Keywords: Thyroid cancer, genetic variants, thyroglobulin (TG), genotypes, association, PCR, RFLP's

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de tiroides es una de las patologías con más frecuencia dentro de la población ecuatoriana con respecto al cáncer y esta estadística ha ido aumentando a través de los años, ya sea por cambios en la actividad humana como la exposición a factores ambientales como por la modernización de las herramientas en la detección de esta enfermedad en etapas tempranas. Una de estas herramientas es la biología molecular cuyo fin es detectar genes que confieran susceptibilidad a enfermedades. Y la ventaja de proporcionar marcadores moleculares es sumar esfuerzos en el aspecto clínico para un diagnóstico pronto y acertado.

En varios países se han realizado estudios genéticos relacionados con el cáncer de tiroides, y dichos estudios pueden ser base para estudiar los genes que confieren susceptibilidad al cáncer de tiroides en la población ecuatoriana. La presente investigación pretende estudiar dos variantes genéticas del gen Tiroglobulina que podrían conferir susceptibilidad al desarrollo y progresión de cáncer de tiroides en pacientes diagnosticados de SOLCA núcleo de Quito.

En una primera parte se describen los aspectos teóricos más relevantes, así como la sustentación de la metodología. Seguidamente se procede a describir los objetivos de la investigación y se describe detalladamente los materiales y métodos utilizados. Y finalmente se presentan los resultados y su correspondiente análisis, junto con las conclusiones y recomendaciones a las que se llega con este proyecto.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. Tema

Asociación de las variantes genéticas Ser734Ala y Arg1980Trp del gen Tiroglobulina (TG) con el riesgo y progresión de cáncer tiroideo bien diferenciado en muestras de pacientes diagnosticados de SOLCA Núcleo de Quito

1.2. Hipótesis

1.2.1. Hipótesis alterna

Las variantes genéticas Ser734Ala y Arg1980Trp del gen Tiroglobulina (TG) están asociadas con el riesgo en el desarrollo y progresión de cáncer tiroideo bien diferenciado en muestras de pacientes diagnosticados de SOLCA Núcleo de Quito.

1.2.2. Hipótesis nula

Las variantes genéticas Ser734Ala y Arg1980Trp del gen Tiroglobulina (TG) no están asociadas con el riesgo en el desarrollo y progresión de cáncer tiroideo bien diferenciado en muestras de pacientes diagnosticados de SOLCA Núcleo de Quito.

1.3. Objetivo

1.3.1. General

Asociar las variantes genéticas Ser734Ala y Arg1980Trp del gen Tiroglobulina (TG) con el riesgo en el desarrollo y progresión de cáncer tiroideo bien diferenciado en muestras de pacientes diagnosticados de SOLCA Núcleo de Quito.

1.3.2. Específicos

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen TG en individuos afectados con cáncer tiroideo en pacientes de SOLCA Núcleo de Quito.
- Asociar la presencia de las variantes genéticas del gen TG con las características patológicas del cáncer tiroideo en pacientes de SOLCA Núcleo de Quito.
- Evaluar la modulación de los factores ambientales (edad, género, alcohol y tabaco), sobre el riesgo de cáncer de tiroides asociado a los genotipos.

1.4. Justificación

Se conoce poco acerca de la etiología del cáncer tiroideo debido a que es una enfermedad indolente, de buen pronóstico, de baja morbi-mortalidad en comparación con otros tipos de cáncer y considerado de estrecha relación con el ambiente; es así que, factores como la alimentación en zonas endémicas con deficiencia de yodo puede existir mayor probabilidad de presentar enfermedades de la glándula tiroidea. La exposición a irradiaciones es uno de los factores más determinantes para presentar esta enfermedad, por ejemplo, desde la catástrofe de Chernóbil en 1986 y los bombardeos atómicos sobre Hiroshima y Nagasaki en 1945, los casos de cáncer tiroideo a nivel mundial han aumentado significativamente según la *International Agency for Research on Cancer*, además puede influenciar el factor genético con la presencia de polimorfismos genéticos que confieren susceptibilidad a una enfermedad (The International Agency for Research on Cancer, 2013, pág. 2).

Según el registro nacional de tumores de SOLCA Núcleo de Quito publicado en el 2006, reportó que en el 2000 hubo 9,09 casos por 100.000 mujeres y en el 2010 subió a 17,93 casos por 100.000 mujeres. Y en el proyecto GLOBOCA 2012, realizado por la Organización mundial de la salud, estimó que en ese año, Ecuador presentó una incidencia de cáncer en hombres de 162 por 100.000 habitantes. Lo que ubica al Ecuador entre los países con máxima advertencia ya que tiene una alta incidencia de cáncer de tiroides en el mundo (Cueva & Yépez, 2014, pág. 144). Según el reporte de IARC-IACR, “Cancer Incidence in five continents Vol IX (2013), las mujeres residentes en Quito con cáncer de tiroides, se ubica en el 8º lugar, entre 70 países. Y en hombres se ubicó en el puesto número 17 de 70 países.

El interés de estudiar el gen TG como gen candidato, se debe a que es una proteína altamente organizada que incluye unidades ricas en cisteína y uno de los responsables del metabolismo de las hormonas tiroideas. Dentro de este gen se estudia las variantes polimórficas en los exones 10 y 33 ya que podrían estar relacionado con el cáncer de tiroides, debido a su localización en exones que corresponden a dominios funcionales de la proteína, donde si una variación afecta la funcionalidad, afectaría con ello a la fisiología tiroidea (Pérez, 2006, pág. 163).

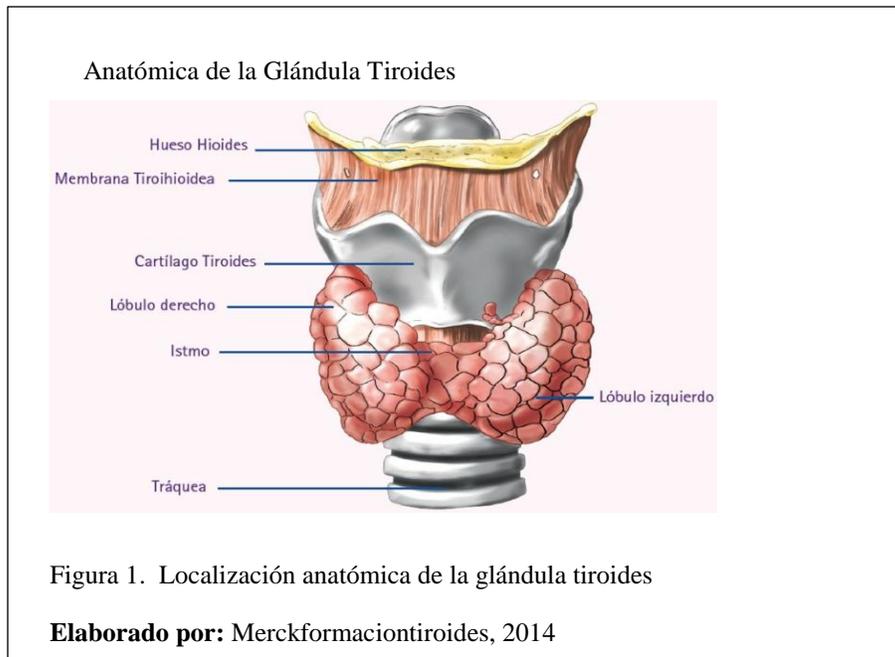
CAPÍTULO 2

LA GLÁNDULA TIROIDES

2.1. Generalidades de la tiroides

La glándula tiroides es una glándula de secreción interna situada en la región anterior central del cuello, por delante de la tráquea y por debajo del cartílago cricoides a la cual se encuentra unida por el tejido fibroso. En la glándula tiroides se distinguen: una parte media, estrecha y delgada llamada *istmo*, es una lámina de tejido delgado de aproximadamente 0,5 cm de grosor, 2 cm de ancho y 2 cm de longitud y a la vez dos partes laterales de gran volumen llamado *lóbulos*, estos están adosados a la tráquea y a las partes laterales de la laringe y cada uno de los lóbulos mide aproximadamente 2 a 2,5 cm de espesor y 4 cm de largo (Rouvière & Delmas , 2006, pág. 450). “En la persona adulta la glándula tiroides puede pesar alrededor de 25- 30 gramos y en la cara posterior de los lóbulos del tiroides, por debajo de ellos normalmente hay dos pares de glándulas paratiroides” (Marín M. , 2010, pág. 51).

“La histología de la glándula tiroides está compuesta por una elevada cantidad de folículos tiroideos cerrados (100 a 300 micrómetros de diámetro) rellenos de una sustancia secretora denominada coloide y revestidos de células epiteliales cúbicas secretoras llamadas tirocitos” (Brandan, Llanos, Rodríguez, & Ruiz Díaz, 2010, pág. 2). En dichos folículos se produce la síntesis de las hormonas Triyodotironina (T3) y la Tiroxina (T4), en tanto que en las células foliculares se sintetiza la hormona calcitonina. En el material coloide, secretado por los tirocitos se encuentra una glucoproteína llamada Tiroglobulina, que produce parte de la formación de las hormonas tiroideas.



2.1.1. Hormonas tiroideas

“Entre las funciones que realiza la glándula Tiroides están la metabolización de yodo, producción, almacenamiento y segregación de las hormonas tiroideas (HT), las cuales son: Tiroxina (T4) y Triyodotironina (T3)” (Rey, 2012, pág. 16).

Esta glándula también secreta la hormona calcitocina, la cual está relacionada con el metabolismo de calcio. Estas hormonas son necesarias para la regulación del metabolismo basal (metabolismo de la energía) y así permiten un correcto desarrollo fetal, el funcionamiento adecuado de los sistemas cardiovasculares, músculo esquelético y hematopoyético, de igual manera está relacionado con respuestas corporales como: producción de calor, consumo de oxígeno y regulación de otros sistemas hormonales (Guyton, 1983, pág. 150).

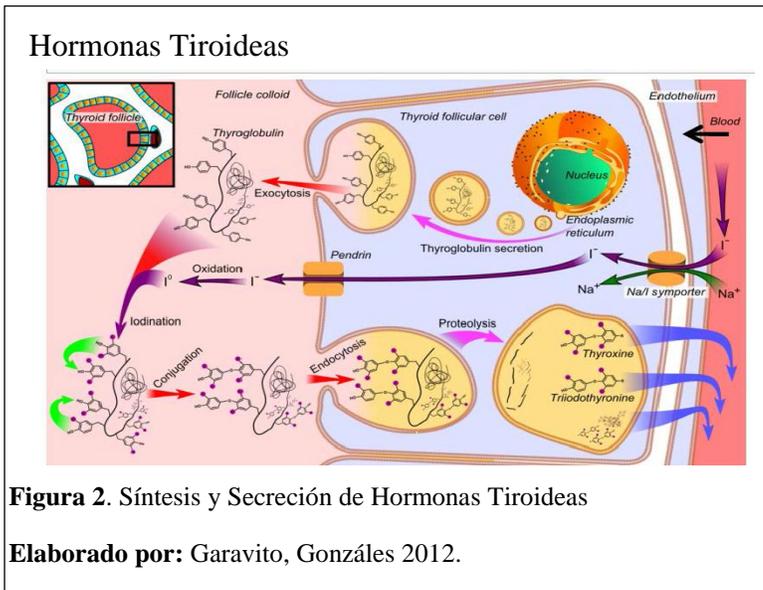
Las hormonas tiroideas T3 y T4 son producidas por las células epiteliales tiroideas de la glándula, la función de las dos hormonas es cualitativamente la misma, difiriendo por su rapidez e intensidad de acción., siendo la T3 cuatro veces más potente que la T4 pero de corta

acción (Guyton, 1983, pág. 150). La tiroxina es producida por las células foliculares de la glándula tiroides, como el precursor tiroglobulina, junto con está actúa la hormona estimulante de la tiroides (TSH) sobre todo en los procesos que controlan la síntesis y liberación de la hormona tiroidea, también actúa aumentando la celularidad y vascularización de la glándula (Rey, 2012, pág. 17).

2.1.2. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas

“Para la síntesis de las hormonas tiroideas se requiere elementos fundamentales: primero un adecuado aporte de yodo exógeno proveniente de la dieta, el yodo es transformado en el intestino por hidrólisis enzimática en yoduro y se transporta por el torrente sanguíneo junto con proteínas como la albúmina hasta llegar a órganos diana” (Rouvière & Delmas, 2006, pág. 478). El 66% del yoduro circulante es secretado por los riñones, en tanto el 33% es capturado por la tiroides en forma inorgánica.

La TG producida por las células foliculares del tiroides que llegan hacia la membranas apical de la luz folicular en forma de vesículas se liberan en el coloides y se forma TG yodada la cual tiene radicales como la monoyodotirosina (MIT), diyodotirosina (DIT), y tetrayodotironina o tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Para la incorporación del yodo a los grupos tirocitos de la TG interviene la tiroperoxidasa (TPO) que es una proteína unida a la membrana de los tirocitos, además es la responsable del acoplamiento de un MIT y un DIT para obtener T3 y de dos DIT para obtener T4 (Guyton, 1983, pág. 151).



2.1.3. Patologías de la tiroides

“Son múltiples las enfermedades de la glándula tiroides y de diversas etiologías, severidad y tratamiento, en general se producen por una alteración en la secreción de yodo, por ingesta de sustancias bociogenas, defectos congénitos de la síntesis de hormonas tiroideas, fenómenos auto inmunitarios y otros más generales como la desnutrición” (Brandan, Llanos, Rodríguez, & Ruiz Díaz, Hormonas Tiroideas, 2010, pág. 3). “La mayoría de estas enfermedades pueden ser causa de una mala función, regulación o secreción tiroidea, una secreción disminuida origina hipotiroidismos y la secreción excesiva origina hipertiroidismo” (Rey, 2012, pág. 77)”.

Una de las manifestaciones más claras en la patologías de la tiroides es el aumento en el tamaño de la glándula este puede ser generalizado cuando hay un incremento de toda la glándula como en el bocio o puede haber un crecimiento localizado en forma de nódulos, el 95% de estos nódulos son benignos pero pueden derivar en malignidad (Pérez, 2006, pág. 15).

En general se considera que el tratamiento para patologías tiroideas puede ser de dos tipos quirúrgico y/o médico, dependiente del diagnóstico de la patología, por ejemplo casos de hipertiroidismo, hipotiroidismo o nódulos pequeños el tratamiento puede ser únicamente médico. Y por otra parte los casos de bocio de gran tamaño o cáncer tiroideo el tratamiento puede ser quirúrgico y/o médico.

2.2. Cáncer de tiroides

2.2.1. Generalidades

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), se define al cáncer como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial que provoca el deceso de alrededor de 1.6 millones de personas por año, esto es el 13% del total de muertes. “El cáncer de tiroides en el Ecuador comparado con los datos mundiales revela que existe mayor incidencia relativa que el promedio mundial, ubicando al Ecuador en el primer cuartil en mujeres y en el segundo cuartil en hombres” (Cueva & Yépez, 2009, pág. 145).

En un estudio realizado desde 1986 al 2005 el Registro Nacional de Tumores afirma:

El número de casos de cáncer ha incrementado de manera significativa, de 158 a 228.7 por cada 100.000 en hombres y en mujeres de 191.5 a 239.2 por cada 100.000. Esto puede ser resultado de un aumento de la población desde 1986 al 2005. Las estadísticas en el Ecuador, revelan que hasta el 2013 hay aproximadamente 200 personas por cada 100 mil habitantes que tienen diagnóstico de cáncer anualmente, aproximadamente son 3000 personas con nuevo diagnóstico de cáncer en el país. (Pág. 56)

“Sobre el cáncer de tiroides los datos demuestran que el incremento desde 1986 a 2005 ha sido de 9.2 por 100 mil a 13.4 por 100 mil.” (Cueva & Yépez, Epidemiología del cáncer en Quito 2006-2010, 2014, pág. 57)

El cáncer de tiroides es una patología en la que se forman células cancerosas en los tejidos de la glándula tiroidea el mismo que se pronostica en base al tipo de células que lo constituyen; teniendo así tres variedades principales (tumores epiteliales, tumores no epiteliales, y de otro origen) no obstante, en el manejo clínico de pacientes, se divide generalmente por categorías bien diferenciado, indiferenciado y medular (National Cancer Institute , 2013).

2.2.2. Cáncer diferenciado

La mayoría de los cánceres de tiroides son diferenciados. En estos cánceres, las células se parecen mucho al tejido normal de la tiroides cuando se observa en un microscopio. Estos cánceres se originan de las células foliculares tiroideas y son cáncer folicular y cáncer papilar.

2.2.2.1. Cáncer folicular

“El carcinoma folicular, es el segundo con mayor frecuencia de los tipos de cáncer de tiroides; representa el 5.1% de todos los tipos de cáncer de Tiroides” (Cueva & Yépez, 2009, pág. 146). “También se caracteriza por manifestarse mayormente en las mujeres, especialmente en aquellas cuya edad promedio oscila entre los 40 a 45 años de edad y en hombres aproximadamente a los 65 años” (Cueva & Yépez, 2009, pág. 146). Además es más frecuente en zonas con pobre consumo de yodo en la alimentación, tiene un buen pronóstico de supervivencia y tiene el mismo tratamiento que el cáncer papilar. “El cáncer de estirpe folicular, a diferencia del papilar, tiene mayor tendencia a propagarse hacia el torrente sanguíneo y desde ahí a pulmones, huesos y ganglios linfáticos” (Moretti, 2000, pág. 519).

Dentro del cáncer folicular encontramos al carcinoma de células de Hurtle, una variedad aún más agresiva y que tiene más frecuencia en hacer metástasis temprana y con un tratamiento más complicado que el folicular, esto se debe a que es menos probable que absorba el yodo radiactivo, el cual se usa tanto para el tratamiento como para el seguimiento.

“La base molecular del cáncer folicular todavía no está bien establecida, aunque se piensa que es radicado por adenomas foliculares, al contrario de los carcinomas papilares que surgirán de Novo” (Chiganer & Ghersevich, 2011, pág. 149). “Sin embargo estudios han demostrado mutaciones en protooncogenes N-RAS y k-RAS, a nivel cromosómico, genes fusionados por translocación (2q:3p) (13:25), que alteran la función de genes como PAX8/PPAR” (OMIM, 2014).

2.2.2.2. *Cáncer papilar*

“Es el carcinoma más frecuente, representa el 83.2% de todos los cáncer de tiroides de Quito” (Cueva & Yépez, 2009, pág. 146). La edad promedio de ocurrencia está entre los 45 años y son más frecuentes en mujeres que en hombres. Generalmente este tipo de cáncer crece de un solo lóbulo de la glándula, suele tener un crecimiento lento y pueden migrar hacia los ganglios linfáticos. Sin embargo, este carcinoma es de buen pronóstico, ya que su tasa de mortalidad es baja y su pronóstico de sobrevida y calidad de vida es bueno.

Estudios moleculares sobre el cáncer papilar han encontrado relación entre alteraciones genéticas: reordenamiento de los genes RET/PTC, (RET/PTC1, RET/PTC3), mutación puntuales en el gen RAS o expresión de Novo de algunos oncogenes o factores de crecimiento como BRAF, TRK (The National Center for Biotechnology, 2014).

2.2.3. Factores de riesgo en el Cáncer de Tiroides

Para que exista un proceso de oncogénesis están involucrados factores genéticos y una serie de eventos ambientales que alteran el correcto funcionamiento de proliferación y diferenciación celular. Un factor de riesgo es cualquier causa que afecte las probabilidades de que una persona padezca una patología. Teniendo en cuenta la combinación de estos factores se pueden considerar los siguientes:

2.2.3.1. *Radiación*

“En la antigüedad todas las afecciones malignas de cabeza y cuello eran tratados con radiación ionizante, de ahí que se ha demostrado que en pacientes expuestos a radiación antes de los 20 años presentan una alta incidencia en cáncer de tiroides” (Ron & Modan , 1982, pág. 837). Ademes se conoce que el riesgo de malignidad de nódulo tiroideo en población general puede ser del 5-10% y en población con historial de irradiación se multiplica hasta 4 veces.

Varios estudios han demostrado un riesgo, debido a las precipitaciones radiactivas de armas nucleares o accidentes en plantas nucleares por

ejemplo, después del accidente de Chernobyl en 1986, se observó un incremento de la incidencia en cáncer de tiroides de 1/106 a 100/106 en niños expuestos (González & Mosso, 2007, pág. 88).

2.2.3.2. Consumo de yodo

Las áreas endémicas de bocio son aquellas que tienen un déficit de yodo exógeno, es decir por el aporte en la alimentación y esto se lo ha relacionado con cáncer de tiroides debido a que la ingesta muy alta o muy baja de yodo podría incrementar esta patología. Cuando hay una carencia de yodo sérico está relacionado con el cáncer de tipo folicular (CFT) asociado a la hiperestimulación de TSH, y cuando existe altas cantidades de yodo sérico está relacionado con cáncer de tipo Papilar (CPT), produciendo un bloqueo en la captación de yodo por la tiroides y provocando hiperproducción de TSH.

2.2.3.3. Sustancias químicas

El uso de sustancias químicas en muchas de las actividades humanas, pueden generar una gran contaminación con productos carcinogénicos, e incluso producir daño tiroideo directo, por ejemplo, en la agricultura el uso de arsénico, benceno y componentes de pesticidas son responsables de un 80 – 90% de los casos de cáncer.

2.2.3.4. Factores genéticos

“Es aceptado el historial familiar como segundo riesgo más conocido para desarrollar una enfermedad. El factor genético representa el 25% de los casos en el carcinoma medular, siendo este el tipo menos frecuente de cáncer de tiroides” (SEOM, 2008, pág. 1). Además se ha estudiado la relación de este tipo de cáncer con una mutación específica en el protooncogén RET. Sin embargo siendo el cáncer medular muy diferente a tumores bien diferenciados de tiroides (papilar y folicular) se podría decir que son otros los factores genéticos que regulan la predisposición a la aparición y comportamiento.

“Alrededor del 5% de las personas que presentan cáncer papilar y el 20- 25% de los que presentan cáncer medular tienen un familiar que lo ha padecido” (Pérez, 2006, pág. 21).

“El carcinoma papilar puede ser también una manifestación de varios síndromes

hereditarios como son el síndrome de Gardner o la enfermedad de Cowden” (SEOM, 2008, pág. 2).

2.2.3.5. *Factores hormonales*

El funcionamiento normal de la glándula tiroidea está mediado por una interacción entre hormonas y factores de crecimiento; si existe un desequilibrio hay un mayor riesgo de presentar una tumorigénesis tiroidea. Un estudio a nivel mundial realizado por National Cancer Institute (2005) muestran datos a favor de un mecanismo hormonal:

- La incidencia es de 2 a 3 veces mayor en mujeres que en hombres. Sobre todo entre los 10 y los 50 años. La proporción masculino-femenino puede variar mucho en diferentes regiones (desde 1,2: 1 a más de 4: 1), aunque siempre a favor de las mujeres.
- Luego de la menopausia se reduce la diferencia en incidencia entre sexos a 1,5:1 (mujer/hombre).
- El riesgo es doble en mujeres con muchos embarazos, y todavía mayor en aquellas con abortos espontáneos, sobre todo si el primer embarazo terminó en aborto.
- Los niveles hormonales de TSH: cuando existen niveles elevados de TSH que provocan una hiperestimulación crónica del tiroides dan como resultado un aumento en el tamaño del tejido debido al incremento en la cantidad de células. Esta estimulación puede generar clones de células foliculares alteradas con un mecanismo defectuoso de reparación del ADN. Lo que generaría que estas células deriven en una neoplasias
- Hormonas Sexuales: Se sabe que el estrógeno eleva los niveles séricos de la tiroglobulina fijadora de tiroxina (TBG, *thyroxine binding globulines*) lo que a su vez eleva los niveles de T4, así que las mujeres tienen niveles de TBG en el 10 y 20% mayores que los de los hombres y aumentan hasta el 50 % durante el embarazo, con un aumento equivalente de la TSH, las elevaciones estrógenos mensuales y durante los embarazos, inducen las elevaciones de TSH que

estimulan el tiroides y favorecen a la larga sus afecciones (González G. F., 1999, pág. 19).

2.2.3.6. *Ingesta de tabaco y alcohol*

El alcohol ejerce una estimulación directa sobre la hipófisis para producir TSH y es uno de los efectos que pudiera explicar su modulación en la tumorigénesis tiroidea: en este caso se considera como un factor de riesgo, aunque el hábito de fumar como el consumo de alcohol tienen un efecto anti-estrógeno que disminuye los niveles de estrógenos lo que genera un efecto protector. Según el estudio de Preston-Martin (2013) el hábito de fumar reduce un 40% el riesgo de cáncer de tiroides.

2.2.3.7. *Afecciones benignas previas*

Existen patologías hereditarias que se han asociado a diferentes tipos de cáncer de tiroides, relacionados con predisposición familiar. Aun así, la mayoría de las personas que padecen cáncer de tiroides no presentan esta condición con antecedentes familiar de la enfermedad. Una anomalía preexistente en la tiroides puede conducir a la transformación de una lesión benigna, o de bajo grado de malignidad, en una lesión maligna o de alto grado de malignidad.

El cáncer medular tiroideo resulta como consecuencia de heredar un gen anormal y en estos casos se conoce como carcinoma medular de tiroides familiar y en combinación con tumores de otras glándulas endocrinas se conoce como neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2).

2.2.4. Factores pronóstico

Existen algunos criterios para determinar los factores pronósticos en una patología como el cáncer de tiroides bien diferenciado, el más aceptado en la actualidad es el (AMES, por sus siglas en inglés), estos son edad, metástasis, diseminación y tamaño. Uno de los factores más importantes podría ser la edad, y el género ya que esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en mujeres mayores de 45 años. Sin embargo otros

factores para la evaluación del paciente es el tipo histológico del carcinoma que puede influir directamente con el pronóstico y la recuperación después del tratamiento.

Dentro de los criterios se encuentra el factor de alimentación, evaluando si existe la ingesta de yodo en la alimentación y junto a este factor otras características ambientales de los pacientes como la exposición de radiación en alguna época de su vida, la exposición prolongada a sustancias químicas y hábitos de consumo de alcohol o de tabaco.

2.3. Marcadores de susceptibilidad

En los procesos de síntesis y secreción hormonal de tiroides se realiza el estudio del gen TG, siendo la proteína más expresada en la glándula tiroidea, por su función en la síntesis y almacenamiento de hormonas tiroideas (T4, T3) y yodo. Con lo cual, si existe una alteración en este gen afectaría directamente la fisiología de la tiroides y se convierte en un importante factor de riesgo para el desarrollo del carcinoma tiroideo (Matakidou A, 2004). Se han identificado 14 polimorfismos de nucleótido simple (SNP's) en el gen TG que tienen una asociación significativa con la tiroiditis autoinmune (Ban Y. G., 2003, pág. 15119), lo que sugiere que el gen TG se perfile como un marcador de susceptibilidad para patologías de la glándula tiroidea.

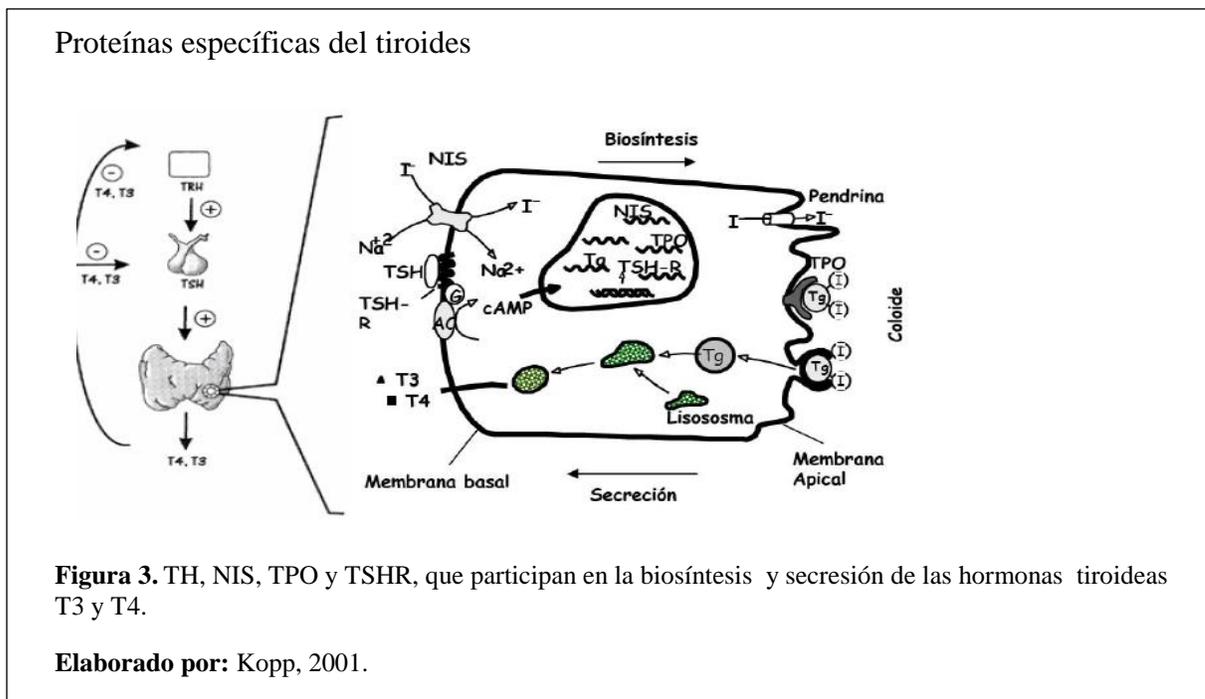
Si existe un polimorfismo o la combinación de varios polimorfismos conocidos como haplotipos, estarían asociados a un cambio en el comportamiento de la enfermedad, pudiendo modificar el riesgo de esta enfermedad, incluso la evolución y la respuesta sobre el tratamiento, así estos polimorfismos pueden actuar como marcadores de susceptibilidad. En la selección de las variantes genéticas del gen TG, se tomó como referencia un estudio realizado por Pérez (2006), donde se evaluaron y asociaron diferentes polimorfismos para diferentes genes de la glándula tiroidea en la población española, el interés es conocer si los polimorfismos SER734ALA y ARG1980TRP, que se asociaron a la ocurrencia de la enfermedad en población española, presentan dicha

influencia en población ecuatoriana y, en base a esto, pueden servir como marcadores de susceptibilidad para progresión y desarrollo del cáncer tiroideo bien diferenciado.

2.3.1. Genes Relacionados con la síntesis de hormonas

El estudio genético de los procesos celulares, de síntesis y de fisiología de las hormonas tiroideas, a la par de las herramientas moleculares permiten obtener mayor información y resultados más confiables sobre el mecanismo de enfermedades. La tiroglobulina (TG), la tiroperoxidasa (TPO), el receptor de la TH (TSHR), o las proteínas acopladas a los receptores, junto con el transportador de yodo dependiente de sodio (NIS), son las moléculas implicadas en la fisiología de la tiroides.

La relevancia que existe en conocer los genes que modulan la actividad fisiológica de la glándula tiroides es debido a que los desequilibrios hormonales son uno de los principales factores que desencadenan una enfermedad del tiroides, por lo cual todos los genes que codifican proteínas para la síntesis y regulación hormonal, podrían conferir susceptibilidad a presentar cáncer de tiroides.



2.3.2. Gen Tiroglobulina (TG)

“La TG es la proteína más expresada en la glándula tiroides, y funciona como almacén para la hormogénesis, almacenamiento de hormonas y yodo” (Matakidou A, 2004, pág. 369).

El gen humano TG fue mapeado en 1985 es el estudio de Baas F, *et al* a través de técnicas de hibridación in situ y análisis de transferencia Southern de híbridos en células somáticas, y ubicó a este gen en el brazo largo del cromosoma 8 y regionalmente en la banda q24, además se muestra que el gen TG se encuentra distal de *c-myc*, hacia el telómero del brazo largo del cromosoma 8. En los últimos años se ha completado la organización estructural del gen TG humano por sondas de Reverse Transcriptase (RT-PCR) y secuenciación.

Esquema del cromosoma 8.



Figura 4. Gen TG localizado en la región 8q24

Elaborado por: GeneCard, 2014.

El gen TG codifica para una glicoproteína de alto peso molecular, 660 KDa, conformada por 5496 aminoácidos y estructurada en dos subunidades de 300 KDa con un 10% de azúcares y 1% de Yodo (OMIM, 2014). Esta proteína se sintetiza exclusivamente en el tirocito, a nivel del retículo endoplásmico y se glicosila en el aparato de Golgi de la célula folicular, constituyendo casi la totalidad del coloide tiroides. Una vez que se ha formado, se localiza en la interfase célula-coloide en donde se produce la yodación y posteriormente, el acoplamiento de las yodotinas útiles en la síntesis de las hormonas tiroideas, para luego depositarse en el coloide (Satiesteban, 2006, pág. 3).

“Se han identificado 14 SNP’s en el gen TG, y más específicamente un grupo de SNP’s, en el exón 10, 12 y 33, que tienen asociación significativa con la tiroiditis autoinmune” (Ban Y. G., 2003, pág. 15120). Estos SNP’s se pueden utilizar para el estudio de los errores innatos en la síntesis de TG y como marcadores de susceptibilidad a enfermedades como el cáncer.

Tabla 1. 14 SNP’s del Gen Tiroglobulina (TG)

Marker name	Allele	SNP location	Nucleotide position	Amino acid position	Amino acid substitution
E10SNP24	T/G	Exon 10	2200	734	Ser/Ala
E10SNP158	T/C	Exon 10	2334	778	Pro/Pro
E12SNP	A/G	Exon 12	3082	1027	Met/Val
E18SNP-20	T/T	Intron 17	-	-	-
E18SNP88	A/G	Exon 18	3935	1293	Asp/Gly
E21SNP	T/C	Exon 21	4506	1501	Ala/Ala
E27SNP-30	C/T	Intron 26	-	-	-
E29SNP	G/A	Exon 29	5512	1837	Asn/Asp
E33SNP	C/T	Exon 33	5995	1980	Arg/TRP
E34SNP 33	A/G	Intron 34	-	-	-
E34SNP 73	G/A	Intron 34	-	-	-
E43SNP4	C/T	Exon 43	7408	2469	Leu/Leu
E43SNP97	T/C	Exon 43	7501	2500	Arg/Trp
E46SNP	C/T	Exon46	7920	2621	Tyr/Tyr

Nota: Ban, Yang 2003.

2.3.2.1. Polimorfismo Ser 734 Ala

“Este polimorfismo se ubica en el exón 10 de la gen TG, designado TG_E10SNP24, que consiste en un cambio de una T por una G en el nucleótido 2200 y dando como resultado ya sea un Ser o Ala en el residuo 734 (S734A)” (OMIM, 2014).

“El exón 10 podría estar relacionado con los sitios hormogénicos y su funcionalidad sería ser aceptor de yodotirosina y dador de yodofenoxil” (Moya , Mendive, Rivolta, Vassart, & Targovnik, 2000, pág. 789). “Además el exón 10 participa en la codificación de las unidades repetitivas ricas en cisteína y se ha sugerido que el dominio de TG responsable de su unión a la membrana se localiza en el exón 10” (Mendive , Rivolta, Moya, Vassart, & Targovnik, 2001, pág. 485). Con lo cual, los cambios en el exón darían como resultado una baja afinidad por su receptor.

2.3.2.2. Polimorfismo Arg 1980 Trp

“La identificación de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el exón 33, designado TG_E33SNP, consiste de un cambio de una C por una T en el nucleótido 5995 del ARNm, lo que resultaría en Arg o Trp. Esta sustitución de aminoácidos en el gen TG, podría predisponer a patologías del tiroides.” (OMIM, 2014, pág. 1).

“El exón 33 fue considerado de interés debido a que sintetiza repeticiones ricas en cisteína las que permiten la correcta estructura terciaria y el plegamiento de las proteínas, facilitando el transporte intracelular” (Collins, y otros, 2004, pág. 6337). “En conclusión si existe un cambio de un aminoácido hidrofílico como la arginina por un hidrofóbico como el triptófano podría alterar la estructura terciaria y por consiguiente la formación de la proteína” (Ban Y. G., 2003, pág. 15120) y debido a este cambio estructural de la proteína, su transporte hasta el sitio de yodación no se podría realizar y ocasionaría deficiencias hormonales.

2.4. Técnicas moleculares para detección de marcadores de susceptibilidad

Los polimorfismos representan la fuente de variación más abundante en el genoma humano, dando las diferencias interindividuales y hereditarias de cada individuo. La identificación de polimorfismos asociados a

enfermedades comunes podría generar información precisa y preventiva, obteniendo diagnósticos tempranos y herramientas para mejorar el tratamiento de este tipo de patologías; resultados conseguidos a través de estudios de asociación de genes candidatos y los polimorfismos dentro de ellos (Suh & Vijg , 2005, pág. 45).

Existen en la actualidad numerosas técnicas para el estudio de variaciones genéticas, poblacionales que permiten explicar patrones mediante marcadores moleculares, estos son segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre variación. Algunas de ellas son aplicables a todo tipo de muestras biológicas, mientras que otras son específicas para cada uno de los materiales de partida (López-Durán , Campo-Trapero , Cano-Sánchez , Díez-Pérez , & Bascones-Martínez , 2010, pág. 2).

Para el uso de las técnicas de detección de marcadores de susceptibilidad, es necesario empezar con la obtención de material genético ya sea ADN, ARN, entre otros, para esto se utiliza las diferentes técnicas de extracción de ácidos nucleótidos, utilizando kits comerciales o extracción manual. Posteriormente se utiliza técnicas como la PCR que es muy utilizada dentro de los procedimientos de detección de marcadores de susceptibilidad, junto con otros como PCR-RFLP's, membranas de poliacrilamida o incluso más sensibles como secuenciación y con los años estas técnicas irán haciéndose más sensibles a la detección de variaciones genéticas.

2.4.1. Extracción y cuantificación

2.4.1.1. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa en la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. Los protocolos de extracción permiten obtener el ADN a partir de diversas fuentes como: sangre, tejidos, muestras de saliva, como material de partida para diferentes herramientas moleculares.

Para hacer más rápida y eficiente la extracción de ácidos nucleicos se utiliza un kit de extracción comercial Pure link Genomic DNA Kits. Este protocolo se basa en el atrapamiento de ADN en una membrana y la materia orgánica es desechada. El Kit provee de todos los reactivos necesarios para la extracción.

2.4.1.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para garantizar buenos resultados en técnica moleculares posteriores a la extracción es necesario una cuantificación precisa del ADN molde. Es así que con una poca cantidad de ADN utilizada en reacciones como la de secuenciación o la de PCR se produce datos de secuencias con baja señal, ruido de fondo, errores y ambigüedades, por otro lado exceso de DNA molde también puede producir efectos similares. Es por ello que la cuantificación de la muestra es un paso previo muy importante para realizar cualquier técnica molecular.

La cuantificación tiene que realizarse cuantitativamente y cualitativamente para evaluar la cantidad de ADN extraído y a la vez la calidad del mismo, ya que podría estar degradada por un mal manejo en su almacenamiento o manipulación. El método cuantitativo puede realizarse mediante la medida de la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro, sin embargo en la actualidad se cuenta con el equipo espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 que puede realizar la lectura de concentración y pureza u automatizado en 15 segundos (Thermo Scientific, 2014).

El método cualitativo confirma la cuantificación y la calidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y comparado con un marcador de concentración conocida. Mediante la electroforesis podremos detectar otros posibles problemas presentes en las muestras, como la presencia de más de un amplificado en el caso de fragmentos de PCR o la detección de dímeros de los oligos utilizados en la amplificación. (De Necochea & Canul, 2004, pág. 23).

2.4.2. Técnica de PCR

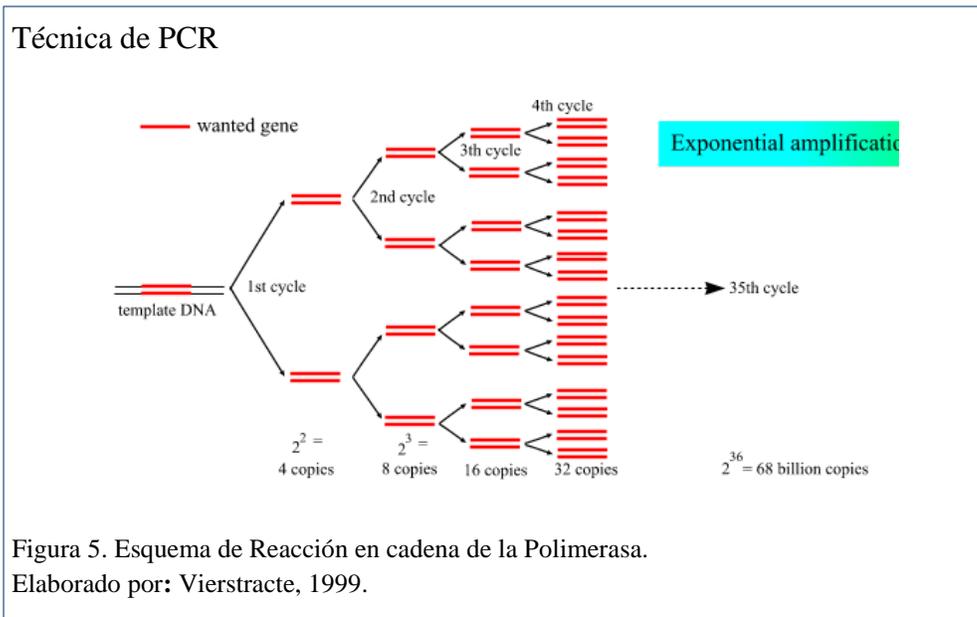
2.4.2.1. Generalidades de la PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) es una técnica molecular muy utilizada por su capacidad replicativa y tiene un límite de detección mucho mayor que otro tipo de técnicas o cualquiera de sus variedades. Es una técnica que tiene varias aplicaciones y se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular; sus aplicaciones van desde la genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense.

La técnica de PCR fue descrita inicialmente por Khorana y colaboradores en 1974, y perfeccionada por Mullis en 1986, llegando a ser una de las más utilizadas actualmente ya que permite la obtención de millones de copias de un fragmento de ADN en solo 30 o 50 ciclos a partir de material genético bicatenario, que posteriormente se separa en dos hebras mediante incremento en la temperatura y cada uno de las hebras aisladas sirve de molde para la síntesis y amplificación de una nueva hebra de ADN (Espinosa Asuar, 2011, pág. 42). Para que se lleve a cabo la técnica se requiere algunos insumos, como la polimerasa que trabaja a temperaturas muy altas ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C). Además se requiere los oligonucleótidos llamados también *primers* que tienen la misma secuencia que una de las cadena de ADN y el otro lleva la secuencia complementaria estos son necesarios para que se inicie la transcripción, también el uso de dinucleotidos (dNTP's) de un amortiguador o buffer, además mantener las condiciones del proceso como el nivel de Ph y determinadas cantidades de magnesio ya que la polimerasa necesita de iones de magnesio para funcionar adecuadamente, sin embargo mucho magnesio inhibe a la polimerasa, y poco puede generar productos inespecíficos. (Pérez de Castro, 2010, pág. 17)

La primera reacción llamada desnaturalización ocurre a 95°C en el cual la cadena de ADN molde se abre o desnaturaliza, quedando en cadena sencilla, después ocurre la

segunda reacción llamada de hibridación a una temperatura promedio entre 40°C y 60°C, durante este periodo se van formando y rompiendo los puentes de hidrogeno de los oligonucleotidos de las cadena simple de ADN y aquellas uniones complementarias más estables se alinearán formando una pequeña región de doble cadena. Aquí actúa la polimerasa uniéndose a este pequeño fragmento de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3' agregando una base más formando un puente de hidrogeno para mantenerse estable para la siguiente reacción. Después, a una temperatura de 72°C ocurre la elongación, la polimerasa alcanza su máxima actividad y genera un millón de copias a partir del fragmento de ADN formados por los oligonucleótidos alineados. Como cada fragmento sirve como base para sintetizar otros en el siguiente ciclo. “El número de copias aumentará exponencialmente con una sola molécula de ADN, en el ciclo 1 se producen $2^1=2$ nuevos fragmentos, en el ciclo 2 serán 2^2 , esto es, 4 fragmentos recién sintetizados, y así, con 35 ciclos de PCR se producirán $2^1 + 2^2 \dots + 2^{34} = 2^{36}$ nuevos fragmentos” (Eguiarte & Souza, 2012, pág. 67).



Para la detección del producto de la PCR se realiza mediante corrido electroforético y dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que deseemos utilizaremos agarosa o acrilamida a distintas concentraciones que servirá de soporte para la separación de fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno. Esto debido a que el soporte forma

una especie de red con agujeros, por la cual obligamos a pasar los fragmentos de ADN, migrando a través de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (P) (Wilches , 2004, pág. 21).

2.4.2.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta útil para localizar y aislar genes de interés, además los datos obtenidos tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de variación y estos pueden ser tratados universalmente. Las variaciones en el ADN se dan por resultado de una mutación en la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido – SNP's), inserción o delección de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación o inversión de fragmentos de ADN” (Rentarías, 2007, pág. 22). “Los diferentes tipos de marcadores se diferencian por su capacidad de identificar polimorfismos en un loci único o múltiples y son de tipos co-dominantes o dominantes”” (Simpson , 1997, pág. 74).

2.4.2.3. PCR-RFLP

El análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's) fue descubierta en 1985 y fue el primer marcador molecular de ADN utilizado por experto en genética de poblaciones. Los RFLP's son causados por rearrreglos del ADN tales como pérdidas, inserciones sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que genera una ganancia o pérdida de sitios de restricción” (Rentarías, 2007, pág. 23).

Esta técnica se usa como marcador, ya que puede mostrar la relación genética entre individuos, sus principales aplicaciones son para los estudios sobre el mapeo genómico, el análisis de enfermedades genéticas, entre otras. “Cuando se utiliza esta técnica para estudios de susceptibilidad a enfermedades genéticas es una herramienta que busca los alelos por RFLP's que muestren patrones de herencia similares a los de la enfermedad, es por eso que si se compara con otra poblaciones se podría predecir el riesgo a contraer esa enfermedad” (Rentarías, 2007, pág. 23).

Mediante este medio se puede evidenciar diferencias presentes en el ADN que son reconocidas por enzimas de restricción únicas (endonucleasas). Cada una de estas enzimas que son de origen bacteriano reconocerán y cortarán solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, por consiguiente cualquier cadena de ADN puede ser reconocida y cortada en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez & Kahl, 2000, pág. 25).

“Para el análisis de RFLP’s, se obtiene un amplicón del gen de interés mediante PCR y posteriormente se realiza la digestión con enzimas de restricción” (Castaño & Bilbao, 1997, pág. 307). Los fragmentos amplificados son revelados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio y estos fragmentos son detectados a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico.

“Esta técnica pese a ser más rápida y fácil de realizar que otras puede presentar desventajas, una de ellas es la necesidad de grandes cantidades de ADN de buena calidad para la detección del loci de copia única” (Rentarías, 2007, pág. 23).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de muestras

Se obtuvo 25 muestras de biopsia de tiroides patológica de pacientes del Hospital oncológico SOLCA Núcleo de Quito, que se recolectó durante los meses de julio a noviembre del 2014 y 25 muestras embebidas de parafina de biopsias de tiroides recolectado en el mes de noviembre del 2014. Los pacientes participantes del estudio firmaron los consentimientos informados. (Anexo 3). Las muestras de ADN control se extrajeron de sangre periférica de voluntarios de la universidad de las Américas diferentes proyectos del Instituto de investigaciones Biomédicas de la misma universidad. Para este estudio se tomaron 50 muestras de ADN y se procedió a la cuantificación.

3.2. Extracción y purificación de ADN

3.2.1. Extracción de ADN a partir de muestras embebidas en Parafina

Pure Link™ Genomic ADN Kits de invitrogen™

Para la extracción de ADN de tejido embebido en parafina se utilizó el kit de extracción *Pure Link™ Genomic ADN Kits de invitrogen™*, empleando el protocolo sugerido por el fabricante, el cual se detalla de la siguiente manera:

Como paso previo se reguló el termobloque a una temperatura de 55°C, para la etapa de lisis celular.

Se cortó una pequeña sección de tejido tumoral (alrededor de 20 mg) usando una hoja de bisturí No. 11, se colocó en un microtubo estéril de 1.5 mL y se añadió a la muestra 1 mL de xilol, se sometió a vórtex durante 2 minutos y se centrifugó la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente, después se desechó el sobrenadante y se repitió este lavado dos veces con xilol con las mismas características anteriormente descritas. Una vez desechado el último sobrenadante se añadió 100 µL de etanol al 100% al tubo y se sometió a vórtex durante 30 segundos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 6000 rpm durante 3 minutos y se desechó el sobrenadante, fue necesario realizar un

lavado más con etanol al 100%, una vez que se desechó el sobrenadante, se colocó los microtubos en la estufa a 73 °C para que se evapore los residuos de etanol por el tiempo necesario, aproximadamente 30 min, una vez que se han secado, se añadió 180 µL de *buffer* de digestión *Purelink*, junto con 20 µL de proteínasa K, se sometió a vórtex por 1 minuto y posteriormente se incubó en el termobloque a 55°C durante toda la noche. Trascurrido este tiempo se centrifugó el tubo a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo estéril de 1.5 mL, luego se añade 20 µL de RNAasa al lisado, se mezcló con vórtex por 1 minuto y dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente, se añadió 200 µL de *Genomic Lysis Binding Buffer* y se mezcló con vórtex, se añadió 200 µL de etanol al 100% y se sometió a vórtex brevemente. Luego se transfirió todo el contenido aproximadamente 640 µL en una columna de purificación *Purelink*TM y se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, luego se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección , se añadió 500 µL de *Buffer 1* de lavado , se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente y se procedió hacer lo mismo que en el paso anterior y se hizo un segundo lavado con *buffer 2* de lavado, se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente, se desechó el tubo de recolección y se coloca la columna de purificación sobre un microtubo estéril de 1.5mL, luego se añadió 50 µL de solución *Buffer de Elución* en la columna y se dejó reposar por 1 minuto, por último se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente para finalmente obtener ADN genómico purificado. Se descarta la columna y se almacena el microtubo con ADN en congelación a -20°C.

3.2.2. Extracción de ADN a partir de muestras de Tejido Tumoral Fresco Pure LinkTM Genomic ADN Kits de invitrogenTM

Para la extracción de ADN de tejido tumoral fresco se utilizó el kit de extracción *Pure LinkTM Genomic ADN Kits de invitrogenTM*, empleando el protocolo sugerido por el fabricante, el cual se detalla de la siguiente manera:

Como un paso previo se reguló el termobloque a una temperatura de 55°C, para el paso de lisis celular.

Primero se colocó la muestra de tejido tumoral fresco en un tubo de microcentrífuga estéril, se añadió 1 mL de *lisis Mix* en el tubo, esto consiste en *lisis buffer* 180 µL y 20 µL *proteínasa K*, asegurándose de que el tejido está completamente inmerso en el tampón de lisis. Se realizó a Vórtex durante 10-15 segundos para mezclar los reactivos con la muestra. Posteriormente se incubó durante toda la noche a 55°C hasta que la lisis se complete.

Trascurrido este tiempo se centrifugó el tubo a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo estéril de 1.5 mL y se añadió 20 µL de RNAasa al lisado, se mezcló con vortex por 1 minuto y se la dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió 200 µL de *Genomic Lysis Binding Buffer* y se mezcló con vórtex. Se añadió 200 µL de etanol al 100% y se sometió a vórtex brevemente. Luego se transfirió todo el contenido aproximadamente 640 µL en una columna de purificación *Purelink™* y se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección, y se añadió 500 µL de *Buffer 1* de lavado, se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente y se procedió hacer lo mismo que en el paso anterior, se realizó un segundo lavado con *buffer 2* de lavado, se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente, se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna de purificación sobre un microtubo estéril de 1.5mL, luego se añadió 50 µL de solución *Buffer de Elución* en la columna y se deja reposar por 1 minuto, por último se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente para finalmente obtener ADN genómico purificado. Se descarta la columna y se almacena el microtubo con ADN en congelación a -20 °C.

3.2.3. Análisis cualitativo y cuantitativo

Para la determinación cuantitativa del ADN extraído se utilizó NanoDrop 2000/2000 Cleaning and *Rondition Thermo Cientific*. Primero se aplicó 3 µL de agua ultra pura en el lector bajo del pedestal, importante no usar agua ionizada u otro líquido para lavar la superficie del instrumento, se bajó el brazo del lector a la columna que contiene el

líquido, se dejó leer por 5 o 7 segundos aproximadamente, se limpió el agua de ambos lectores (arriba y abajo) del pedestal con un papel absorbente

Para iniciar el blanqueo se tomó 2 μL de *Purelink Genomic Elution buffer*, y se esperó la lectura por 5 o 6 segundos luego se limpió la muestra de ambos lectores con papel absorbente, posteriormente se realizó la primera medición con la misma muestra del blanqueo, tomando 2 μL de *Purelink Genomic Elution buffer*, se limpió la muestra de ambos lectores con papel absorbente y por último se procedió a medir las concentraciones de ADN tomando 2 μL de ADN extraído, se colocó en el lector y se lo cerró, luego se esperó por 5 o 7 segundos. Una vez terminada la lectura de todas las muestras se lavó el lector superior e inferior con agua ultra pura y se cerró el programa.

Para la determinación cualitativa, se realizó electroforesis en gel de agarosa, la concentración a la cual es preparado depende del tamaño de molécula de ADN a analizarse. En este caso se preparó un gel de agarosa al 2%.

Se preparó la cantidad de agarosa grado biología molecular necesaria para alcanzar el volumen deseado de gel al 2%, se disolvió la agarosa en *Buffer TBE 1X* y se aforó al volumen final deseado, se calentó la solución casi hasta ebullición en microondas durante 2 min, hasta que la agarosa se disuelva completamente en el *Buffer TBE 1X*. Se añadió bromuro de etidio para teñir el gel, en una relación de 2 μL del mismo por cada 20 mL de *TBE 1X* empleado. Se dispensó la mezcla en una cubeta para electroforesis con peiqueta y se dejó solidificar la misma a temperatura ambiente. Una vez listo el gel se procedió a cargar las muestra en cada uno de los pocillos, adicionando 3 μL de carga (*Blue Juice Loading buffer 10x, invitrogen*) para 7 μL de muestra. Se colocó 3 μL de marcador de peso molecular de 100pb (100 bp DNA Ladder (100-3000bp), (LabNet International, Inc.) en el primer pocillo del gel que sirvió como referencia el peso de ADN que se va analizar. La migración por electroforesis se realizó por 45 min a 100v, y los resultados obtenidos se visualizaron en el transiluminador ImagenQuant 300 (*GE Healthcare life Sciences*) a una longitud de onda de 365 nm.

3.3. Determinación del genotipo

3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.3.1.1. Especificación de cebadores

Los cebadores empleados para la amplificación de los exones 10 y 33 del gen TG, fueron definidos por Ban en el 2003, las características de los cebadores están descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de interés del gen de Tiroglobulina (TG)

Exón	Cambio de nucleótido	Secuencia 5' → 3'	fragmentos	Producto PCR
10	SER734ALA T → G Nt 2200	F 5'GGTTTTATCTGGTCTTTCC 3' R 5'CAGCCTCATACAGACTTTGA 3'	TT = 376 TG=376,281,95 GG=281, 95	376
33	Arg1980Trp C → T Nt 5995	F 5'CACTCATGCATATTGACCAA 3' R 5'CTGAGGATTTGTAAGCAT 3'	CC=148, 176 CT =324,148,176 TT= 324	324

Nota: (Pérez, 2006, pág. 98)

3.3.2. Amplificación del exón 10

Las concentraciones y cantidades de los reactivos utilizados para la amplificación del fragmento de 376 pb, en el exón 10 del gen TG. Se describe en la siguiente tabla:

Tabla 3. Reactivos y concentraciones para amplificar el polimorfismo Ser734Ala del gen TG

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1x (ul)
AND		10 ng	2
Buffer	10x	1x	2.5
MgCl ₂	50mM	2 mM	0.8
dNTP's	10mM	0.2mM	0.5
cebador Fw	10	0.2	1
Cebador Rv	10	0.2	1
Platinum Taq Polimerasa	5 U/ul	1.5 U	0.3
Agua Ultra Pura			21.9
Volumen Final			30

Nota: Peralta, Natalia 2015.

El programa de amplificación se detalla en la tabla 4 usando el termociclador (*Multigene Labnet international, Inc.*), el revelado de los resultados se observaron por corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, en el transiluminador ImagenQuant 300 (*GE Healthcare life Sciences*).

Tabla 4. Programa de amplificación del polimorfismo Ser734Ala, Gen TG.

N° Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94	5 min
30	Desnaturalización	94	1 min
	Hibridación	59	1min
	Elongación	72	1min
1	Elongación final	72	5 min
1	Temperatura de mantenimiento	4	∞

Nota: Peralta, Natalia 2015.

3.3.3. Amplificación del exón 33

Las concentraciones y cantidades de los reactivos utilizados para la amplificación del fragmento de 324pb, en el exón 33 del gen TG. Se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y concentraciones para amplificar el polimorfismo Arg1980Trp del gen TG

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1x (ul)
ADN		10 ng	2
Buffer	10x	1x	2.5
MgCl ₂	50mM	2 mM	0.8
dNTP's	10mM	0.2mM	0.5
cebador Fw	10	0.2	1
Cebador Rv	10	0.2	1
Platinum Taq Polimerasa	5 U/ul	r1.5 U	0.3
Agua Ultra Pura			21.9
Volumen Final			30

Nota: Peralta, Natalia 2015.

El programa de amplificación se detalla en la tabla 6 usando el termociclador (*Multigene Labnet international, Inc.*), el revelado de los resultados se observaron por corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, en el transiluminador ImagenQuant 300 (*GE Healthcare life Sciences*)

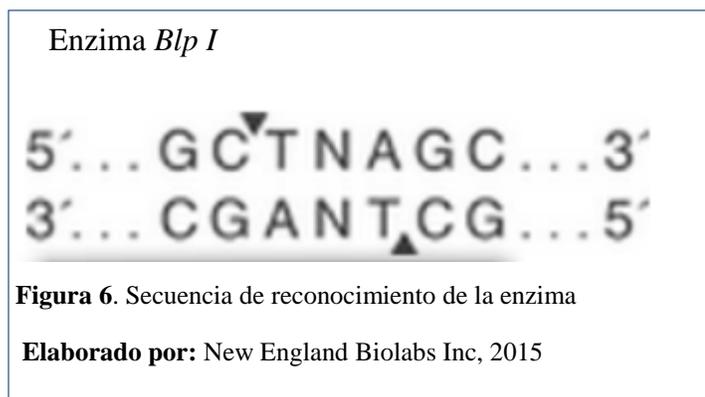
Tabla 6. Programa de amplificación del polimorfismo Arg1980Trp del gen TG.

N° Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94	5 min
30	Desnaturalización	94	1 min
	Hibridación	59	1min
	Elongación	72	1min
1	Elongación final	72	5 min
1	Temperatura de mantenimiento	4	∞

Nota: Peralta, Natalia 2015.

3.3.4. Digestión del amplicón de la región de interés del exón 10

El polimorfismo corresponde a un SNP localizado en el exón 10, del gen Tg, que consiste en un cambio de base T por una G en el nucleótido 2200 y dando como resultado ya sea un Ser o Ala, respectivamente en el residuo 734 (S734A). La digestión del producto de PCR de la región de interés del exón 10 se realizó con la enzima de restricción *Bln I* de *New England Biolabs Inc.* El genotipo resultante de los individuos para el polimorfismo puede ser homocigoto (TT o GG) o heterocigoto (TG).



Para el reconocimiento y revelado de la digestión con enzima se utilizó el siguiente protocolo detallado en la tabla 7.

Tabla 7. Concentración y Volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón 10

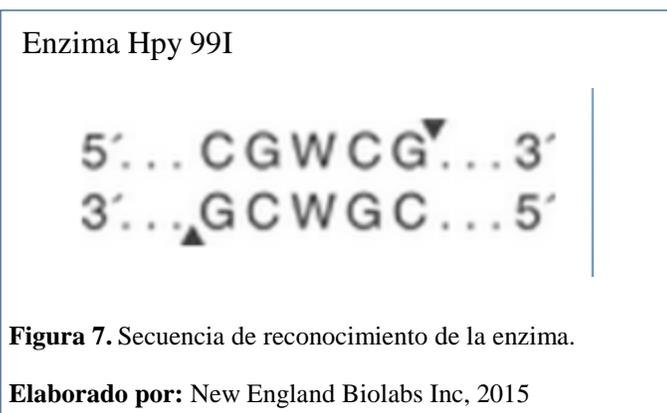
Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1x (U)
PCR			15
Buffer	10x	1 x	1.5
Enzima <i>Blp I</i>	50 U/ul	7 U	0.6
Volumen Total			20

Nota: Peralta, Natalia 2015.

La digestión se realizó durante toda la noche a 37°C en la incubadora. Finalmente las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 4%. La enzima *Blp I* tiene una diana de corte en el alelo variante 734 Ala cortando el amplificado en dos fragmentos, mientras que el alelo sin cambio Ser734 no se digiere. El genotipo homocigoto normal Ser/Ser, se identifica al observar una banda de 376pb, el genotipo homocigoto variante Ala/Ala, se identificó al observar 2 bandas de 281pb y 95pb, y el genotipo heterocigoto Ser/Ala al observar 3 bandas de 376pb, 281pb y 95pb.

3.1.1. Digestión del amplicón de la región de interés del exón 33

El polimorfismo corresponde a un SNP localizado en el exón 33, del gen *Tg*, que consiste en un cambio de base C por una T en el nucleótido 5995 y dando como resultado ya sea una base Arg o Trp, respectivamente en el residuo 1980 (A1980T). La digestión del producto de PCR de la región de interés del exón 33 se realizó con la enzima de restricción *Hpy 99I* de *New England Biolabs Inc*. El genotipo resultante de los individuos para el polimorfismo puede ser homocigoto (TT o CC) o heterocigoto (TC).



Para el reconocimiento y revelado de los resultados de digestión se utilizó el siguiente protocolo detallado en la tabla 8.

Tabla 8. Concentración y Volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón 10

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1x (UI)
PCR			15
Buffer	10x	1 x	1.5
Enzima <i>Hpy 99I</i>	50 U/ul	7 U	0.6
Volumen Total			20

Nota: Peralta, Natalia 2015.

La digestión se realizó durante toda la noche a 37° C en la incubadora. Finalmente las muestras se corrieron en gel de agarosa al 4%. La enzima *Hpy 99I*, tiene la diana en el alelo sin cambio 1980Arg, cortando en dos fragmentos y el que tiene el cambio 1980Trp permanece sin digerir. El genotipo homocigoto normal Arg/Arg, se identificó al observar 2 bandas de 148pb y 176pb, el genotipo homocigoto variante Trp/Trp al observar una banda de 324pb y el grupo heterocigoto Arg/Trp al presentar 3 bandas de 324pb, 148pb, 176pb.

3.2. Análisis de datos

Para el análisis de frecuencia alélica de los datos tanto para las muestras casos, como las muestras control, se dividió el número de alelos alterados para el número total de alelos estudiados en el grupo siendo el doble de individuos estudiados debido a que cada individuo posee dos alelos. Además se calculó la frecuencia genotípica para los grupos casos y controles, para esto se divide el número de individuos con cada genotipo para el número total de individuos. Para determinar el equilibrio en la población estudiada se suma de frecuencias genotípicas y para un solo locus debe ser igual a 1,00 y las frecuencias esperadas se obtienen a partir de las frecuencias alélicas mediante la ecuación de Hardy-Weinberg $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

3.2.1. Chi- cuadrado

Chi-cuadrado (χ^2) es una prueba estadística que a través de una elección permite contrastar hipótesis, esta herramienta se emplea en el análisis de dos o más grupos y de dos o más variables. Dichas variables se ordenan en “tablas de frecuencias” o “tablas de contingencia”, las cuales permiten relacionar entre variables y comparar su grado de ocurrencia (Suárez, 2012, pág. 1)

“Esta prueba estadística trabaja con las frecuencias de las observaciones, es decir con los números crudos observados y no con porcentajes, ya que estos últimos enmascaran el efecto real de los datos originales” (Yáñez, 2010, pág. 75).

La prueba trabaja con la diferencia entre las frecuencias observadas y las frecuencias esperadas, la fórmula para (χ^2) es:

Chi-cuadrado (χ^2)

$$\chi^2_{prueba} = \frac{(o_1 - e_1)^2}{e_1} + \frac{(o_2 - e_2)^2}{e_2} + \frac{(o_3 - e_3)^2}{e_3} + \dots + \frac{(o_n - e_n)^2}{e_n}$$
$$\chi^2_{prueba} = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

Figura 8. Fórmula para cálculo de (χ^2)

Elaborado por: (Suárez, 2012, pág. 1)

Siendo:

O= el valor observado,

E= el valor esperado

Para cualquier “tabla de contingencia”, los grados de libertad corresponden al número de valores en la tabla que hay que especificar para fijar todos los demás.

3.2.2. Odds Ratio

“El concepto de Odds Ratio se define como la asociación entre un evento y la vulnerabilidad a éste, el cual puede ser cuantificado mediante el empleo del riesgo relativo (RR) y Odds ratio (OR)” (Sócrates , Pavlov, & Clavero, 2010, pág. 52). Este concepto corresponde a la razón entre la probabilidad de que un evento ocurra y la probabilidad de que no ocurra. Para el cálculo de esta prueba estadística se utiliza la siguiente fórmula.

En este caso Odds Ratio corresponde a:

Ejemplo

$$\text{o bien } OR = \frac{a / b}{c / d} = \frac{a \times d}{c \times b}$$

Figura 9.Tabla en estudio de casos y controles por OR
Elaborado por: (Merino, 2007, pág. 1)

En la interpretación de OR es necesario tener en cuenta cuál es el factor o variable predictiva que se estudia y cuál es el resultado o desenlace. Entonces cuando se obtiene un valor de OR inferior a la unidad se interpreta como que el desenlace es menos frecuente en la categoría o grupo que se ha elegido como de interés si en el grupo de referencia el evento ocurriera por azar (Sócrates , Pavlov, & Clavero, 2010, pág. 53).

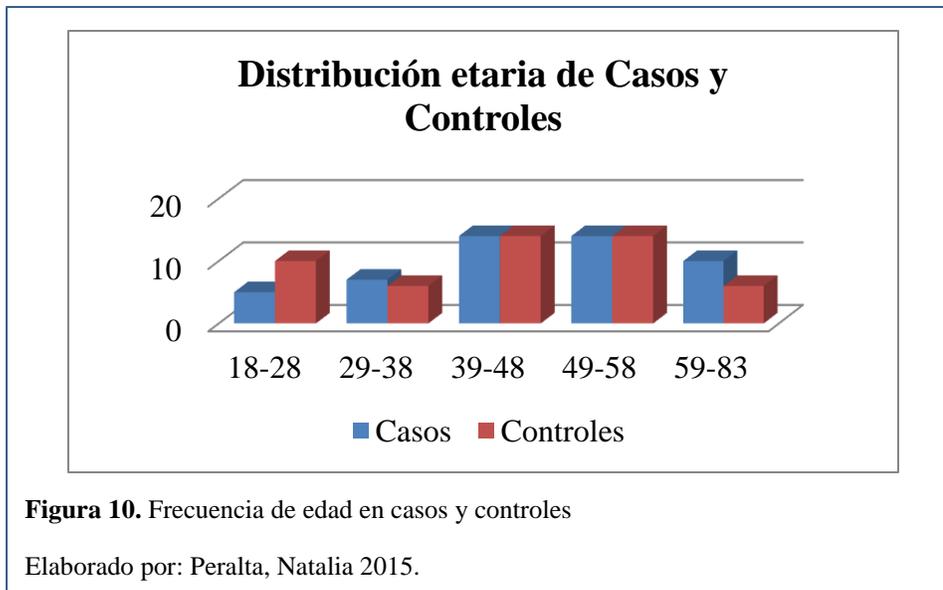
CAPÍTULO 4

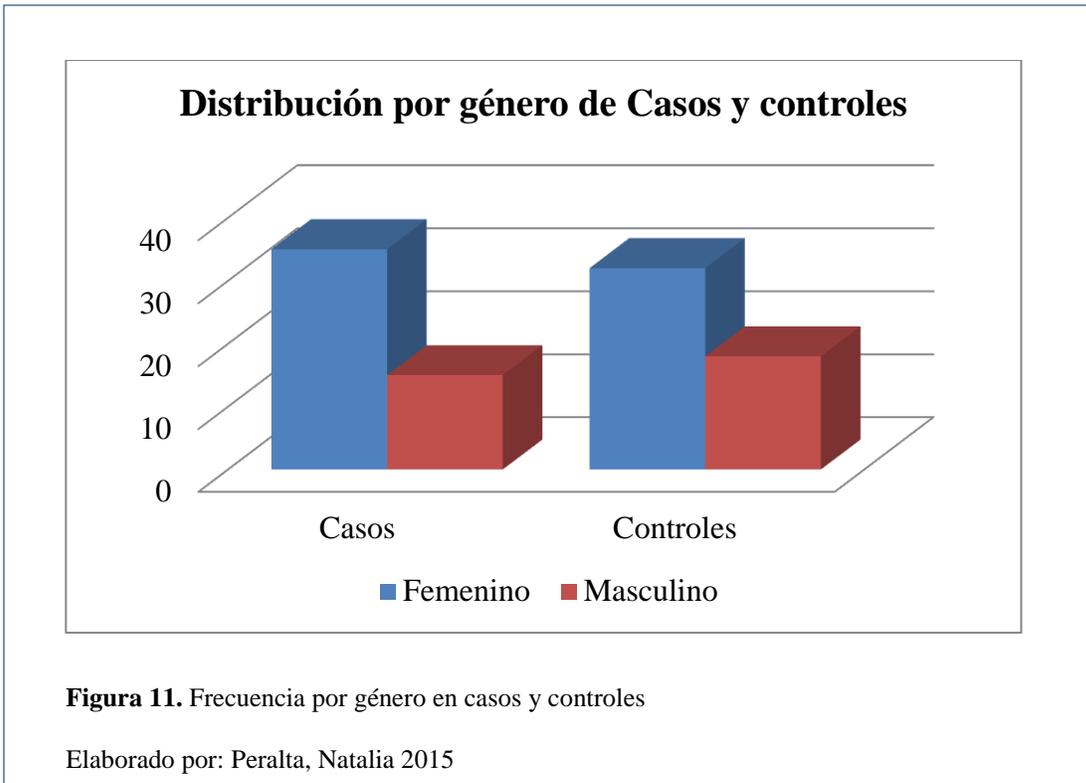
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Edad y Sexo

Dentro del grupo de 50 muestras de pacientes con cáncer de tiroides, la edad promedio es de 47, en un rango que va de los 18 a los 68 años. En el análisis se encontró que 28 pacientes (56%) se sitúan sobre la edad promedio y 22 pacientes (44%) están en un rango inferior.

En cuanto a la relación por género 14 corresponden a sexo masculino (28%) y 36 a sexo femenino (72%). Esto corresponde a una relación 2.5:1, lo que concuerda con lo descrito en el Registro Nacional de tumores en epidemiología del cáncer en Quito, en cuya recopilación de datos desde 1994 hasta el 2006 se identificó un promedio de 194 casos nuevos por año y en los varones la incidencia también aumenta, pero con una proporción mucho menor. Observamos que en los casos de estudio más del 50% tiene una edad superior a los 40 años lo que concuerda con lo descrito por *la American Cancer Society*, donde hay un predominio femenino en un rango de 40 a 59 años y en menor número de casos de hombres con un rango 60 a 79 años. En la figura 10 y 11 se muestran los grupos de pacientes con cáncer de tiroides por género y por grupos etarios.



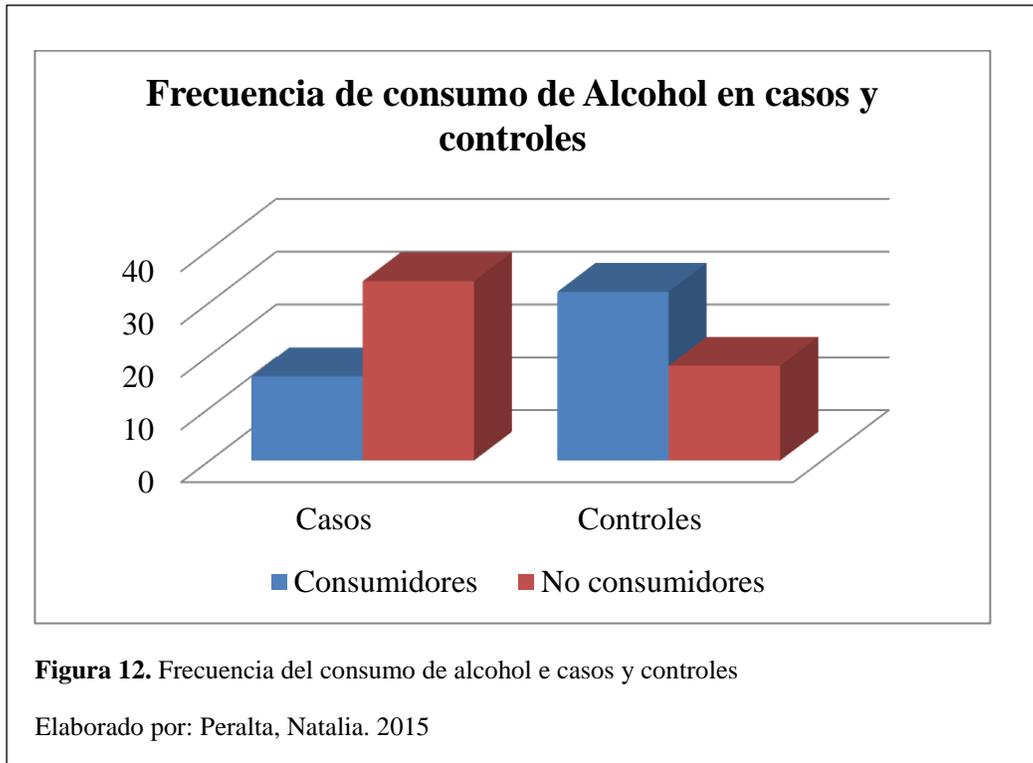


4.2. Consumo de alcohol

Para analizar el consumo de alcohol, se dividió el grupo de estudio en consumidores y no consumidores, es así como el nivel de riesgo son un tanto arbitrarios, puesto que las cantidades de alcohol consideradas como de riesgo son dinámicas y dependen del sexo y de las características individuales (étnica, peso, capacidad metabólica, salud, etc.)

Dentro del grupo de pacientes la proporción de individuos que consumen alcohol es menor con 32% frente al 68% que no consumen alcohol. La proporción de individuos en el grupo control fue 64% de consumidores y 36% no consumidores de alcohol.

En la figura 12 Se muestra los grupos de pacientes con cáncer de tiroides por consumidores y no consumidores.



4.3. Consumo de tabaco

En lo que respecta al hábito de fumar, se dividió al grupo de casos en fumadores y no fumadores; siendo la proporción de no fumadores, mayor con un 86% en relación a la proporción de fumadores con el 14%. El grupo control tiene una proporción de fumadores menor con un 46%, en relación a la proporción de no fumadores de 54%. En la figura 13 se muestra los grupos de pacientes con cáncer de tiroides por consumidores y no consumidores de tabaco.

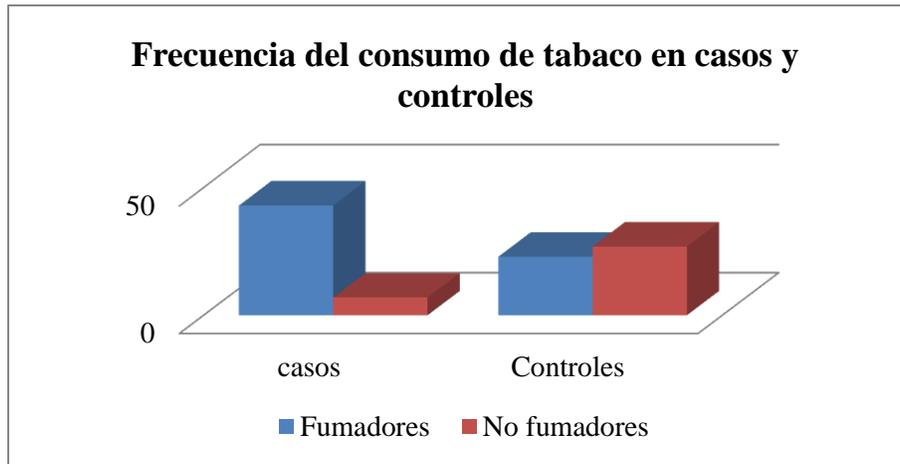


Figura 13. Frecuencia del consumo de tabaco en casos y controles
Elaborado por: Peralta, Natalia 2015.

4.4. Extracción de ADN

Después de realizada la extracción de ADN de las 25 muestras de tejido embebido en parafina, se obtuvo ADN genómico, cuya presencia fue comprobada mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 2%; tal como lo podemos observar en la figura 14.

Gel de agarosa de la extracción de ADN parafinas

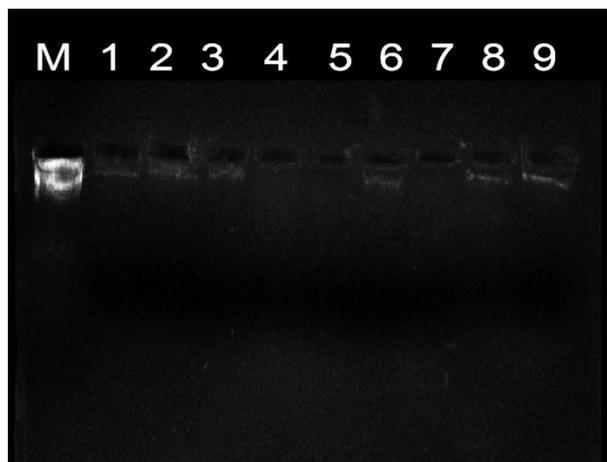


Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de ADN genómico de muestras embebidas en parafina.

Elaborado por: Peralta, Natalia 2015.

Después de realizada la extracción de ADN de las 25 muestras de tejido tumoral fresco, se obtuvo ADN genómico de buena calidad, cuya presencia fue comprobada mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 2% tal como podemos observar en la figura 15.

Gel de agarosa de la extracción de ADN tumores

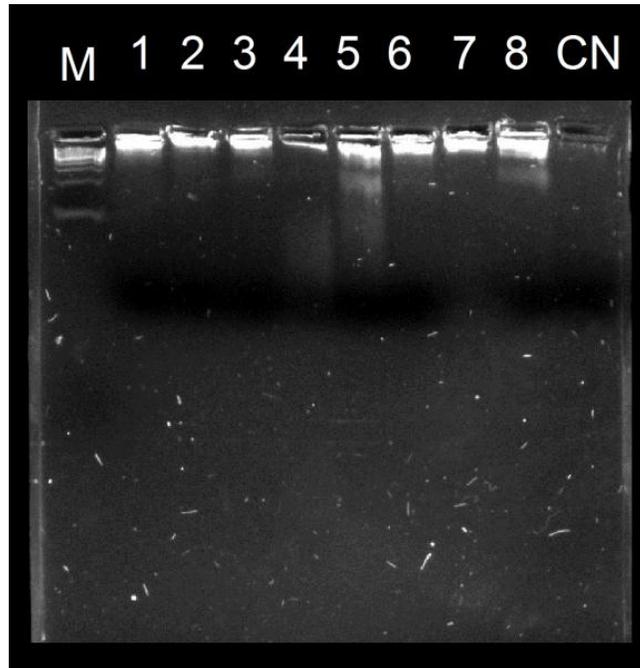


Figura 15. Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de ADN genómico de muestra tumoral fresca.

Elaborado por: Peralta, Natalia 2014.

La cuantificación de ADN total se realizó por espectrofotometría. Para el grupo de casos se obtiene un rango de 6,6 ng/ μ l a 588.4 ng/ μ l, el promedio de ADN extraído de parafina fue de 76.88 ng/ μ l, y el promedio de ADN en tumores 191.68 ng/ μ l. Por otro lado las muestras de ADN de los individuos control se obtiene en un rango de 7 ng/ μ L a 122 ng/ μ l, y una concentración promedio de 86 ng/ μ l.

El material biológico conservado en bloques embebidos en parafina representa la fuente primaria e invaluable de información en investigaciones, principalmente de tipo retrospectivo, esto es por su facilidad de obtención y almacenamiento durante largos

periodos de tiempo y lo que le permite seguir siendo una fuente básica de ADN genómico. Pero pese a mantener estas características también pueden presentarse problemas significativos en el momento de su extracción, ya que se podría observar una degradación de los ácidos nucleicos durante el proceso de fijación de la muestra en el bloque de parafina, por ejemplo: “El uso de formaldehído puede producir entrecruzamientos entre ácidos nucleicos y proteínas, hidrolizando los enlaces fosfodiéster del ADN lo que da como resultado ADN de mala calidad con exceso de inhibidores” (De Armas, Capó, & González, 2006, pág. 172), teniendo así una incidencia directa en los procedimientos posteriores como la amplificación y secuenciación, pues los resultados a obtener serían menos exitosos.

Para evitar que la parafina interfiera con las técnicas moleculares posteriores fue necesario realizar tres lavados con xilol y uno con etanol, para garantizar el contacto de los reactivos de extracción con la muestra biológica de interés; las desventajas encontradas al utilizar esta fuente de ADN fue que algunas muestras contenían poca cantidad de ADN o de mala calidad reflejada en el gel de agarosa al 2% lo que impedía que la amplificación del gen TG en la técnica de PCR resulte satisfactoria; para lograr con éxito este procedimiento fue necesario realizar un ensayo de dilución de las muestras de ADN extraído para garantizar la disminución de inhibidores.

Por otra parte los resultados obtenidos de las muestras de tejido tumoral fresco, además de presentar una alta concentración de ADN, demostró una buena calidad la cual fue observada en el gel de agarosa al 2%, siendo así óptima para los procesos posteriores a la extracción.

4.5. Determinación del genotipo

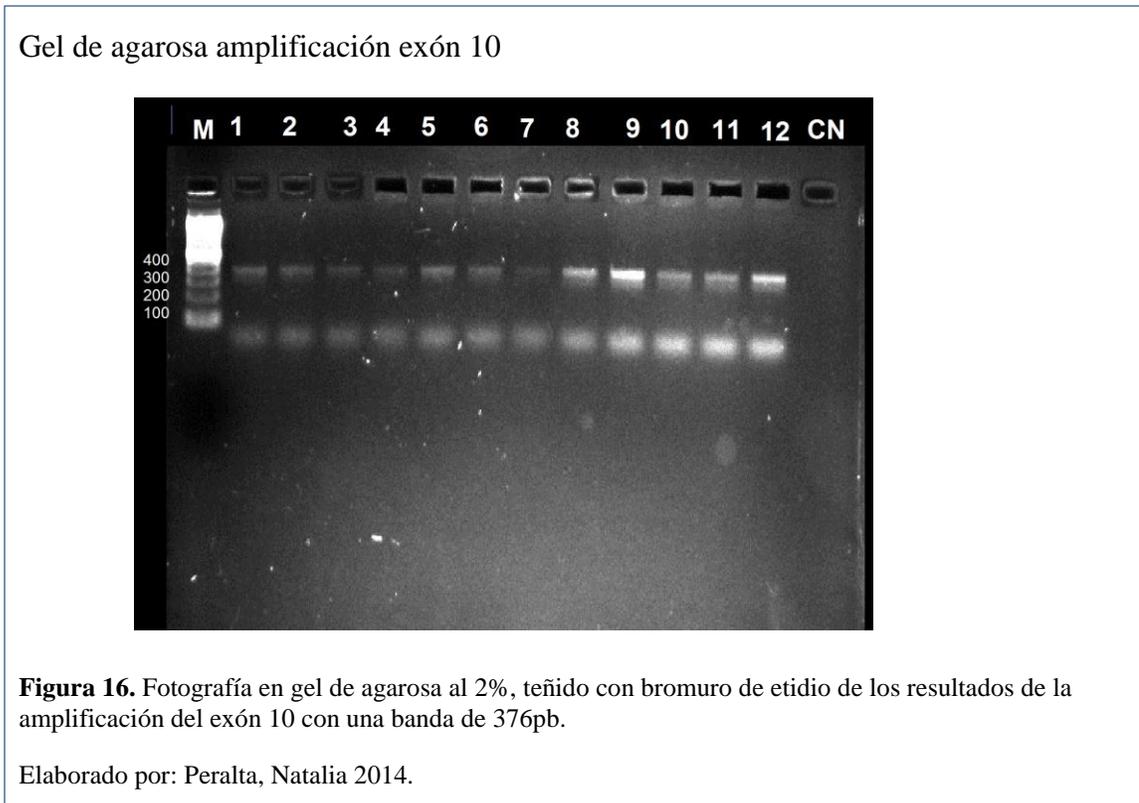
4.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Mediante la técnica de PCR se amplificaron los dos fragmentos de interés, el exón 10 y el exón 33 del gen TG, que contienen los polimorfismos de estudio.

4.5.1.1. Amplificación del exón 10

Se obtuvo la amplificación de un fragmento de 376pb del exón 10 del gen TG, que contiene el polimorfismo Ser734Ala, tanto en los grupos afecto como en los grupos

controles, los resultados fueron observados en un gel de agarosa al 2%, en el transiluminador ImageQuant 300, como se presenta en la figura 16.



4.5.1.2. Amplificación exón 33

Se obtuvo la amplificación de un fragmento de 324pb del exón 33 del gen TG, que contiene el polimorfismo Arg1980Trp, tanto en los grupos afecto como en los grupos controles, los resultados fueron observados en un gel de agarosa al 2%, en el transiluminador ImageQuant 300, como se presenta en la figura 17.

Gel de agarosa amplificación exón 33

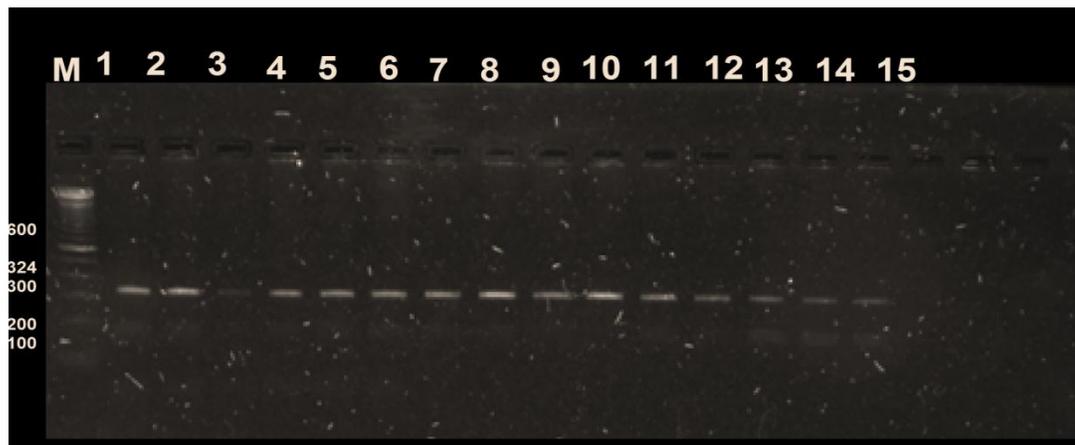


Figura 17. Fotografía en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 33 con una banda de 324pb

Elaborado por: Peralta, Natalia 2015

4.5.2. Digestión con enzimas de restricción

Los productos de amplificación de los exones 10 y 33 del gen TG, que contienen los polimorfismos de interés, se digirieron con enzimas de restricción específicas, revelando así sus genotipos.

4.5.2.1. Digestión del amplicón del exón 10

Los resultados de la técnica de PCR- RFLP con la enzima Bln I, del amplicón de 376pb son observados en gel de agarosa al 4%, esto debido a que los cortes de la enzima dan como resultado una banda de 95pb casi en el límite del Ladder con marcador de 100pb, es por ello que a mayor porcentaje se observa una mejor migración del ADN sin que se pierda el fragmento amplificado. La fotografía se muestra en la figura 18.

Digestión del amplicón 10

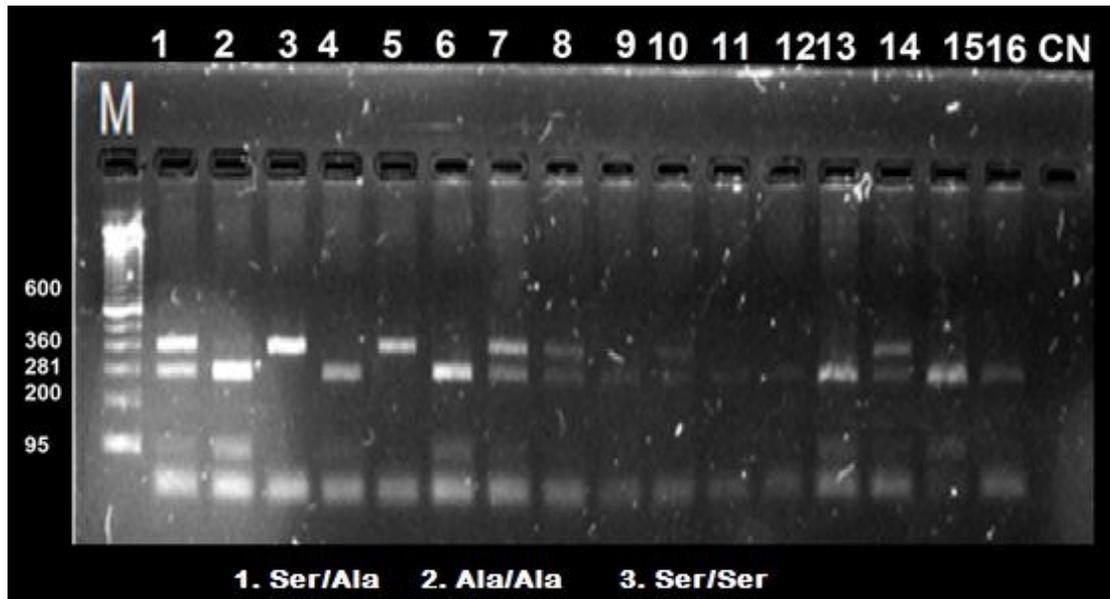


Figura 18. Fotografía de un gel de agarosa al 4%, teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con B1p I, del producto de PCR del exón 10. En el carril 1 se observa el genotipo Ser/Ala, en el carril 2 el genotipo Ala/Ala en el carril 3 el genotipo Ser/Ser

Elaborado por: Peralta, Natalia 2015.

4.5.2.2. Digestión del amplicón del exón 33

Los resultados de la técnica de PCR- RFLP con la enzima Hpy 99I, en un amplicón de 324pb son observados en gel de agarosa al 4%, esto debido a que los cortes de la enzima dan como resultado dos bandas, una de 176pb y otra de 148pb muy cercanos entre sí, es por ello que a mayor porcentaje se observa una mejor migración del ADN sin que se pierda el fragmento amplificado. La fotografía se muestra en la figura 18.

Digestión del amplicón 33

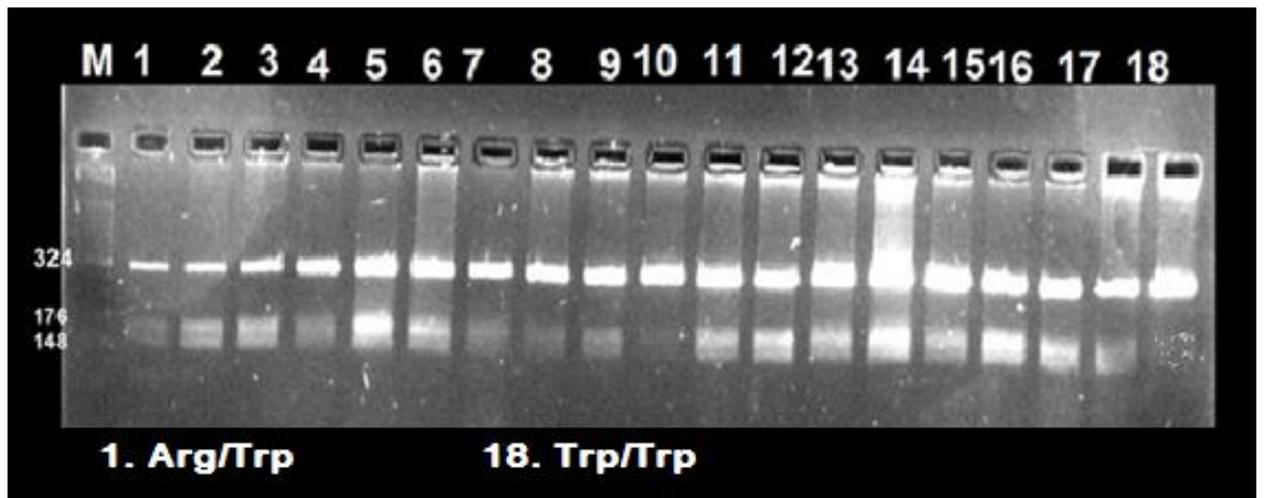


Figura 19. Fotografía de un gel de agarosa al 4%, teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con Hpy 99I, del producto de PCR del exón 33. En el carril 1 se observa el genotipo Arg/Trp y en el carril 18 el genotipo Trp/Trp.

Elaborado por: Peralta, Natalia 2015

Un desequilibrio en el metabolismo de la glándula tiroidea puede generar patologías como el cáncer, es por esto que los genes responsables de codificar proteínas para la síntesis y secreción de hormonas tiroideas serían de gran interés en los estudios de dicha enfermedad. “La relevancia que tienen los genes que codifican para TG y TSHR en las patologías benignas del tiroides los hacen candidatos de susceptibilidad al cáncer de tiroides” (Matakidou A, 2004, pág. 371).

Existen varios estudios de asociación genética a los carcinomas de mayor incidencia a nivel global, como colon, mama, piel, entre otros. Sin embargo los estudios genéticos del cáncer de tiroides no tienen una amplia investigación a nivel mundial, debido a que esta enfermedad presenta baja mortalidad y buen pronóstico. Según análisis previos sobre epidemiología del cáncer de tiroides hay indicadores de la interacción de factores ambientales como radiación ionizante, enfermedades benignas previas del tiroides como factores de riesgo relevantes. De igual manera existen pocos ensayos a nivel mundial de asociación entre polimorfismos de TG y cáncer de tiroides, sin embargo existe un estudio el cual plantea la hipótesis de que la variante polimórfica Gln2511Arg de TG

incrementará la susceptibilidad a desarrollar cáncer tiroideo no medular. “Como resultado se sugirió que puede contribuir significativamente a la incidencia de carcinomas no medulares de tiroides” (Matakidou A, 2004, pág. 372).

Se ha realizado estudios sobre si el alelo T confiere susceptibilidad a enfermedad autoinmune de la tiroides (AITD3; 608.175). En un estudio de 1.214 pacientes de raza blanca en el Reino Unido con dicha enfermedad, se examinaron los mismos SNP's en el gen TG como los estudiados por Ban et al. (2003), Collins et al. (2004) y se encontró una evidencia de asociación de esta variante con AITD.

En el estudio realizado por Ban en el 2003 en pacientes de raza caucásica en población Norte Americana dio como resultado que el gen TG está relacionado con la enfermedad autoinmune de la tiroides (AITD) y que una combinación de al menos dos SNP's del gen TG, confiere susceptibilidad para dicha enfermedad. Además, el exón 33 mostró evidencia en conferir susceptibilidad a la enfermedad de Graves. Y en el 2012 se realizó la misma asociación de polimorfismos del gen TG en población Asiática y el cual podría conferir susceptibilidad para AITD. Otro estudio de susceptibilidad fue realizado por Collins en el 2004 en pacientes de Reino Unido confirmo la presencia de cuatro polimorfismos en exón 10,12 y 33 que confieren susceptibilidad a dicha enfermedad.

El estudio realizado por Pérez 2006, en población española dio como resultado que todas las variantes polimórficas estudiadas en los exones 10, 12 y 33 incrementaron la susceptibilidad a padecer cáncer de tiroides, se presume que debido a su localización en exones correspondientes a dominios funcionales de la proteína, podría alterar su funcionalidad y con ello la fisiología tiroidea.

4.6. Frecuencia de alelos

Una vez recopilados los genotipos observados por medio de digestión enzimática (exones 10 y 33), se analizaron las frecuencias alélicas de cada polimorfismo. Los resultados de los genotipos de las 100 muestras para el polimorfismo Ser734Ala se detallan en el anexo 4 y los genotipos de las 100 muestras para el polimorfismo Arg1980Trp se detallan en el anexo 5.

4.6.1. Polimorfismo Ser734Ala

Del grupo de pacientes de cáncer de tiroides, 4 fueron homocigotos normales (TT), 17 fueron homocigotos raros (GG) y 29 fueron heterocigotos (TG). En el grupo de controles se encontró que 5 fueron homocigotos normales (TT), 16 fueron homocigotos raros (GG) y 29 fueron heterocigotos (TG). En cuanto a la frecuencia del alelo T, en los casos afectados fue de 0.37 y 0.39 en los controles; mientras que la frecuencia del alelo G en casos y afectados fue de 0.63 y 0.61 respectivamente. Con el equilibrio de Hardy Weinberg, se obtuvieron valores que muestran que el grupo de individuos afectados y controles se encuentra en equilibrio con un valor de 1. La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Estadística descriptiva de los polimorfismos Ser734Ala

Población	Genotipo	Nº individuos	%	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica	χ^2 HWE
Afectos	Ser/Ser (T/T)	4	16	0,08	37 (0.37)	1
	Ser/Ala (T/G)	29	50	0,58		
	Ala/Ala (G/G)	17	34	0,34	63(0.63)	
	Total	50				
Controles	Ser/Ser (T/T)	5	10	0,10	39 (0.39)	1
	Ser/Ala (T/G)	29	50	0,58		
	Ala/Ala (G/G)	16	40	0,32	61(0.61)	
	Total	50				

Nota: Peralta, Natalia 2015

4.6.2. Polimorfismo Arg1980Trp

Del grupo de pacientes de cáncer de tiroides, 47 fueron heterocigotos (CT), 3 fueron homocigotos raros (TT) y no se encontraron homocigotos normales (CC). En el grupo de controles se encontró que 35 fueron heterocigotos (CT), 15 fueron homocigotos raros (TT) y no se encontraron homocigotos normales (CC). En cuanto a la frecuencia del alelo C, en los casos afectos fue de 0.47 y en los controles 0.35; mientras que la frecuencia del alelo T en casos y afectos fue de 0.53 y 0.65 respectivamente. Mediante el análisis de Hardy Weinberg, realizado para cada grupo, se obtuvieron valores igual a 1 que muestran que los individuos afectos si se encuentran en equilibrio al igual que el grupo de pacientes. La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Estadística descriptiva del polimorfismo Arg1980Trp

Población	Genotipo	Nº individuos	%	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica	χ^2 HWE
Afectos	Arg/Arg (C/C)	0	0	0.00		1
	Arg/Trp (C/T)	47	94	0,47	47 (0.47)	
	Trp/Trp (T/T)	3	6	0,53	53(0.53)	
	Total	50				
Controles	Arg/Arg (C/C)	0	0			1
	Arg/Trp (C/T)	35	70	0,35	35(0.35)	
	Trp/Trp (T/T)	15	30	0,65	65(0.65)	
	Total	50				

Nota: Peralta, Natalia 2015

Para el polimorfismo Ser734Ala, podemos ver que las frecuencias presentada por el alelo variante G es de 0.63 en pacientes y 0.61 en controles y el alelo T presenta una frecuencia del 0.37 en pacientes y 0.39 en controles lo que hace pensar que no existe diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de ambos grupos, lo que

concuerta con un estudio realizado a nivel mundial realizado a un grupo de 1000 individuos de diferentes continentes dando como resultado un promedio de 64% para la presencia el alelo variante G y el 36% para el alelo T.

Para el polimorfismo Arg1980Trp, podemos ver que la frecuencia del alelo variante T en pacientes es 0.55 y ligeramente mayor en controles 0.65 lo que nos indica que la variante genética no estaría asociada a la enfermedad pese a presentar diferencias significativas entre grupos. Por otro la frecuencia presentada por el alelo normal C en pacientes es 0.47 frente a 0.35 en controles lo que hace que se detecten diferencias entre las frecuencias alélicas de ambos grupos. En estos datos podemos ver que tanto en el grupo control como en el grupo de los afectos, la presencia del alelo variante T está en mayor proporción que el alelo C, lo que a diferencia del estudio, anteriormente mencionado, realizado a un grupo de 1000 individuos en el que un 33% de la muestra presentaba el alelo variante T y el 67% el alelo C.

4.6.3. Análisis estadístico

El análisis de Chi cuadrado nos permite conocer la asociación de los genotipos con los grupos bajo estudio y determinar el nivel de significación de la variante genética entre ambos grupos. Los resultados estadísticos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Análisis de Chi- cuadrado para los grupos estudiados para cada polimorfismo

Polimorfismo Ser734Ala					
Genotipo	Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala	χ^2	P
Casos	4	29	17	0,084	0.65
Controles	5	29	16		
Polimorfismo Arg1980Trp					
Genotipos	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	χ^2	P
Casos	0	47	3	9.756	0.004
Controles	0	35	15		

Nota: Peralta, Natalia 2015.

Para el polimorfismo Ser734Ala se encontró que el valor de χ^2 es 0.084 y p es igual a 0.75, siendo este un valor de probabilidad no significativo puesto que es mayor a 0.05, lo que indicaría que no existen diferencias entre grupos, esto se debe a que el genotipo

Ser/Ser se encuentra en igual proporción en casos como en controles; de igual manera ocurre con el genotipo variante Ala/Ala ya que también se encuentra un equilibrio entre casos y controles.

En cuanto al polimorfismo Arg1980Trp, se obtuvo 9,756 como valor de x^2 y p es igual a 0.004 siendo este un valor menor a 0.05, mostrando diferencias significativas entre los grupos, es decir la presencia del genotipo Arg/Trp se encuentra en mayor frecuencia frente al genotipo Ala/Ala, tanto en casos como en controles, es decir la presencia del alelo variante es similar en proporción que el alelo normal.

En la tabla 11 se detalla el análisis estadístico para el polimorfismo Ser734Ala y el polimorfismo Arg1980Trp.

Tabla 11. Análisis de los genotipos observados para cada polimorfismo

Polimorfismo Ser734Ala del Exón 10					
Genotipo/Gr	Casos	Control	OR	IC95 %	P
Ser/Ser	4	5	0.800	0.195 a 3.283	0.757
Ser/Ala	29	29	0.941	0.400 a 2.213	0.891
Ala/Ala	17	16	0.753	0.171 a 3.313	0.707
Polimorfismo Arg1980Trp del Exón 33					
Genotipo/Gr	Casos	Control	OR	IC95 %	P
Arg/Arg	0	0	0.747	0.015 a 38.584	0.885
Arg/Trp	47	35	67.143	1.803 a 24.999	0.005
Trp/Trp	3	15	4,429	0.074 a 264.037	0.476

Nota: Peralta, Natalia 2015.

Dentro del polimorfismo Ser74Ala no se encuentra un genotipo relevante al obtener Odds ratios menores a la unidad, es decir que la presencia de un genotipo no es factor de probabilidad para presentar la enfermedad, de igual manera la probabilidad no es significativa siendo valores mayores a 0.05.

Por otro lado el polimorfismo Arg1980Trp el genotipo Arg/Trp presenta relevancia a la enfermedad con un OR de 67.143 y una probabilidad significativa lo que se traduce que la presencia de este genotipo en un individuo le daría un riesgo de 67 veces más de padecer la enfermedad.

A diferencia del estudio realizado por (Pérez, 2006, pág. 181), donde sí se encontró una relación entre ambos polimorfismos y su incidencia en el desarrollo de cáncer de tiroides, donde para Ser734Ala los resultados obtenidos fueron OR de 1,51 (1.14- 1,99) y un valor de probabilidad de 0.001; por su parte en el caso de Arg1980Trp el valor de OR fue de 2,35 (1.50- 3.66) y su probabilidad menor de 0.001, presentando ambos un equilibrio alélico. Como conclusión se podría decir que el gen TG podría ser un marcador de susceptibilidad para dicha enfermedad en población española. Además en el polimorfismo Arg1980Trp se encontraron los 3 genotipos dentro de los 442 participantes.

“Entre otros estudios de asociación del gen TG está el estudio en el riesgo de enfermedades autoinmunes murina y humanas, resultando buenos marcadores de susceptibilidad a la enfermedad de Graves y a la tiroiditis de Hashimoto, en población norteamericana” (Ban Y. G., 2003, pág. 15123). “Estos resultados fueron comparados en el estudio de Collins y colaboradores, donde no encontraron asociación entre las variantes y el desarrollo de la enfermedad autoinmune en población de Reino Unido” (Collins, y otros, 2004, pág. 6338). “Por último se evaluó en la población asiática la variante del exón 33, donde no encontraron influencia del polimorfismo sobre el desarrollo de enfermedades autoinmunes de tiroides” (Ban, y otros, 2012, pág. 37504).

4.6.4. Modulación de los factores ambientales (edad, género, alcohol y tabaco)

4.6.4.1. Género

Para conocer la relación que existe entre los factores ambientales con el desarrollo de cáncer de tiroides se realizó Odds ratios que nos permite conocer el riesgo relativo que tiene cada uno de los genotipos sobre la predisposición a la enfermedad. Los resultados se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Análisis estadístico, estratificado por género, para los grupos en estudio con el cáncer de Tiroides.

Polimorfismo Arg1980Trp								
	Mujeres		OR 95 % IC	P	Hombres		OR 95 % IC	P
Genotipos	Casos	Controles			Casos	Controles		
Arg/Trp	32	23	3,130 (0.858 - 11.417)	0.0839	14	12	15,08 (0.770 - 295.205)	0.0738
Trp/Trp	4	9			0	6		
Polimorfismo Ser734Ala								
	Mujeres		OR 95 % IC	P	Hombres		OR 95 % IC	P
Genotipos	Casos	Controles			Casos	Controles		
Ser/Ser	4	0			5	0		
Ser/Ala	24	5	2.020 (0.094 - 43.291)	0.6529	17	12	7,857 (0.397 - 155.421)	0.1758
Ala/Ala	8	9	5,400 (1.393 -20.922)	0.0147	10	6	0.850 (0.242 - 2.976)	0.7994

Nota: Peralta, Natalia, 2015

La distribución de genotipos para el polimorfismo Arg1980Trp estratificado por género muestra que en mujeres se presenta mayormente el genotipo Arg/Trp, lo que confiere un OR igual a 3,13 y una probabilidad asociada de 0.08, ligeramente mayor a 0.05. Lo que significa que hay 3 veces mayor probabilidad de presentar este genotipo en mujeres Y en el caso de hombres esta probabilidad es mayor con un valor de OR igual a 15.080 y una probabilidad estadística asociada de 0.073 ligeramente superior a 0.05.

Por otro lado el polimorfismo Ser734Ala, muestra un valor de 0.01 para *p* en el genotipo Ser/Ala, lo que significa que las mujeres podrían presentar más frecuentemente este cambio de base cuando tienen la enfermedad. Sin embargo en el grupo de hombres no se encontró diferencias entre grupos, ni alguna asociación entre el género y la predisposición a presentar un genotipo.

El alto porcentaje de casos de mujeres con cáncer de tiroides se justificaría en relación a las hormonas sexuales, principalmente con el incremento en los niveles de estrógenos ya que estos elevan los niveles séricos de la tiroglobulina fijadora de tiroxina (TBG, *thyroxine binding globulines*) lo que a su vez eleva los niveles de T4, es así que las mujeres tienen niveles de TBG de entre 10% y 20% mayores que en hombres, los cuales pueden aumentar hasta un 50% durante el embarazo, con

incrementos equivalentes de la TSH; el aumento de estrógenos mensuales y durante los embarazos inducen a las elevaciones de la TSH que estimulan la tiroides y a la larga favorecen a sus afecciones (González G. F., 1999, pág. 125).

4.6.4.2. Edad

Tabla 13. Análisis estadístico, estratificado por género, para los grupos en estudio con el cáncer de Tiroides.

Polimorfismo Ser734Ala				
Genotipo	39-48	49-58	OR	P
Ser/Ser	0	1		
Ser/Ala	10	8	0.412 (0.015 a 11.458)	0.6011
Ala/Ala	4	5	1,5625 (0.312 to 7.819)	0.5870
Polimorfismo Arg1980Trp				
Genotipo	39-48	49-58	OR	P
Arg/Trp	12	15	0.269 (0.010 a 7.189)	0.433
Trp/Trp	1	0		

Nota Peralta, Natalia, 2015

Se realizaron análisis con dos grupos de edad obtenidos sin que se aprecie diferencia significativa para ninguno de ellos. La interacción entre el genotipo y la edad no tuvo efecto significativo sobre el riesgo en ninguno de los polimorfismos del gen TG. Las OR fueron inferiores a la unidad en la mayoría de los casos

4.6.4.3. Consumo de alcohol y tabaco

El análisis estratificado por hábitos de consumo de alcohol y tabaco, para los grupos en estudio, se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Análisis estadístico, estratificado por consumo de alcohol, para los grupos en estudio con el cáncer de Tiroides.

Polimorfismo Ser734Ala del Exón 10					
Genotipo	Alcohol	No alcohol	OR	IC95 %	P
Ser/Ser	4	5	0.800	0.195 a 3.283	0.757
Ser/Ala	29	29	1,539	0.646 a 3.663	0.331
Ala/Ala	13	20	1,231	0.278 a 5.454	0.785
Polimorfismo Arg1980Trp del Exón 33					
	Alcohol	No alcohol	OR	IC95 %	P
Arg/Arg	0	0	0.785	0.015 a 40.518	0.904
Arg/Trp	46	36	1,022	0.366 a 2.855	0.967
Trp/Trp	10	8	0.811	0.015 a 45.22	0.103

Nota: Peralta, Natalia 2015

Por otra parte los resultados obtenidos para el consumo de alcohol muestran un OR menor a 1 considerado como un factor protector lo que significaría que el consumo de alcohol podría disminuir la probabilidad de tener cáncer de tiroides. Este resultado es corroborado por Preston, Franchesci, Ron y Negri en el 2003, en cuyo estudio no se encontró asociación, por el contrario, el consumo de alcohol es citado como factor que disminuye el riesgo de padecer cáncer tiroideo, debido a que el alcohol actúa en el organismo como anti-estrógeno, al igual que sucede con el hábito de fumar. (González G. F., 1999, pág. 128). Por otra parte en el estudio realizado por Pérez 2006, en población española encuentra significancia entre el genotipo Arg/Arg con el consumo de alcohol; donde el riesgo para estos individuos fue de 0,27 veces menor que para los no bebedores del mismo genotipo.

Tabla 15. Análisis estadístico, estratificado por consumo de cigarrillo, para los grupos en estudio con el cáncer de Tiroides.

Polimorfismo Ser734Ala del Exón 10					
Genotipo	no tabaco	tabaco	OR	IC95 %	P
Ser/Ser	3	6	0.159	0.035 a 0.721	0.017
Ser/Ala	44	14	5,500	2.170 a 13.939	0.0003
Ala/Ala	12	21	0.8750	0.1844 to 4.1510	0.867
PolimorfismoArg1980Trp del Exón 33					
	no tabaco	tabaco	OR	IC95 %	P
Arg/Arg	0	0	2,5319	0.049 a 1.33	0.6447
Arg/Trp	23	59	0.7797	0.262 a 2.324	0.6551
Trp/Trp	6	12	1,923	0.034 to 108.515	0.751

Nota: Peralta, Natalia 2015

En el polimorfismo Ser734Ala se encuentra el genotipo Ser/Ala con un OR de 5.5 y un valor de probabilidad significativo lo que significativa que las personas que presenten este genotipo tiene 5 veces más probabilidad de presentar la enfermedad si consumen tabaco. En el polimorfismo Arg1980Trp el genotipo Arg7Trp presenta un valor de 2.53 pero sin probabilidad estadística significativa, estos valores comparados con un estudio realizado por Pérez 2006, en la población española se determinó que el consumo de tabaco no tuvo efecto significativo sobre ninguno de los SNP's en estudio, teniendo un valor de OR inferior a 1, incluyendo el genotipo Ala/Ala del exón 10 con un OR igual a 0.67 que sin embargo no presenta riesgo de significación estadística. Un estudio similar realizado por Preston, Francheschi, Ron y Negri en el 2003, sugiere que el consumo habitual de tabaco se asocia a la reducción en un 40 % de riesgo a presentar cáncer de tiroides.

4.6.4.4. Asociación estratificado por tipo de cáncer

El cáncer bien diferenciado puede constituir dos estirpes, cáncer papilar y cáncer folicular, se analizaron las variantes genéticas estratificando por tipo de estirpe, los resultados se detallan en la tabla 16.

Tabla 16. Estudio de la asociación de las variantes genéticas del gen Tg, estratificado por tipo de cáncer

Polimorfismo Arg1980Trp				
Genotipo	Papilar	Folicular	OR 95 % IC	p
Arg/Trp	39	8	3,658 (0.192 a 69.679)	0.3883
Trp/Trp	3	0		
Polimorfismo Ser734Ala				
	Papilar	Folicular	OR 95 % IC	p
Ser/Ser	3	3	0.346 (0.039 a 3.080)	0.3414
Ser/Ala	13	2	6,500(0.731 a 57.831)	0.0932
Ala/Ala	26	3	18.000 (2.113 a 153.311)	0.0082

Nota: Peralta, Natalia 2015

En el polimorfismo Arg1980Trp se encontraron los genotipos Arg/Trp y Trp/Trp en los 50 pacientes, de los cuales 39 fueron diagnosticados con cáncer de tiroides papilar y presentaron genotipo Arg/Trp y solo 3 pacientes presentaron el genotipo variante Trp/Trp. Con respecto al cáncer de estirpe folicular solo 8 pacientes presentaron el genotipo Arg/Trp y ninguno el genotipo variante, dentro del análisis de OR se obtuvo un valor de 3.658 pero sin probabilidad estadística significativa. Para el genotipo Arg/Trp,

Se puede concluir que la variante genética no está asociada a presentar cáncer papilar o cáncer folicular. En un estudio similar en población europea se encontró que un cambio en la base incrementó la susceptibilidad a desarrollar cualquiera de los dos tipos de cáncer diferenciados.

Con respecto al polimorfismo Ser734Ala, se muestra que en el cáncer papilar hay un predominio con el genotipo variante Ala/Ala, seguido por la heterocigosidad del genotipo variante Ser/Ala, y para el cáncer de estirpe folicular; 3 pacientes con el genotipo variante Ala/Ala y 2 para el genotipo variante Ser/Ala. Después dl análisis de OR se obtuvo el valor del genotipo Ser/Ala 6.500 pero la probabilidad estadística no era significativa, pero por otro lado el genotipo Ala/Ala presento un OR de 18.00 y una

significancia de 0.008 lo que se traduce que hay 18 veces más de probabilidad de presentar cáncer papilar si se tiene este genotipo. Con esto se concluye que el genotipo Ala/Ala podría estar relacionado positivamente con la ocurrencia del cáncer de tiroides papilar. “Resultados similares se presentan en el estudio Europeo donde se muestran diferencias significativas con valores de OR mayores para la variante Ala/Ala, sin embargo este efecto fue independiente del carácter histológico del carcinoma, ya que este genotipo incrementó la susceptibilidad tanto en las variantes foliculares como papilares” (Pérez, 2006, pág. 112).

CONCLUSIONES

No se encontró asociación de las variantes genéticas Ser734Ala y Arg1980Trp del gen tiroglobulina (TG) con el riesgo en el desarrollo y progresión de cáncer tiroideo bien diferenciado en muestras de pacientes diagnosticados de SOLCA Núcleo de Quito. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula.

El polimorfismo Ser734Ala presenta los tres genotipos para el grupo de casos; 4 homocigotos normales (TT), 17 homocigotos raros (GG) y 29 heterocigotos (TG). En el grupo de controles se encontró que 5 fueron homocigotos normales (TT), 16 homocigotos raros (GG) y 29 heterocigotos (TG). En cuanto a la frecuencia del alelo T, en los casos afectos fue de 0.37 y en los controles de 0.39; mientras que la frecuencia del alelo G tanto en controles como en afectos fue de 0.63 y 0.61 respectivamente.

Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo Arg1980Trp fueron 47 heterocigotos (CT), 3 homocigotos raros (TT) y no se encontraron homocigotos normales (CC), en el grupo de casos y en el grupo de controles se encontró que 35 fueron heterocigotos (CT), 15 homocigotos raros (TT) y no se encontraron homocigotos normales (CC). En cuanto a la frecuencia del alelo C, en los casos afectos fue de 0.47 y en los controles 0.35; mientras que la frecuencia del alelo T en controles 0.65 y en afectos fue de 0.53.

Dentro de la variante genética Arg1980Trp, los genotipos Arg/Trp y Trp/Trp, no están asociados a presentar una mayor incidencia para el cáncer papilar ni para el cáncer folicular.

En la variante genética Ser734Ala, el genotipo Ala/Ala tiene una mayor probabilidad de presentar cáncer de tiroides de estirpe papilar.

El genotipo Arg/Trp presenta mayor probabilidad de ocurrencia en hombres que en mujeres. Por su parte el genotipo Ala/Ala se presenta en mayor frecuencia en mujeres.

Existe un fuerte predominio de la enfermedad entre los 39 y 58 años con un promedio de 47 años. En el estudio por genotipos no se encontró relación con ninguna de las variantes en estudio.

Como resultado de este estudio se determinó que existe mayor ocurrencia en el hábito de fumar relacionado con el genotipo Ser/Ala.

Según los resultados de esta investigación el consumo de alcohol está asociado con la disminución en la frecuencia de la enfermedad, es así que podría disminuir la probabilidad de tener cáncer de tiroides bien diferenciado.

El kit empleado junto con el protocolo de extracción de ácidos nucleicos sugerido por invitrogen permitió obtener ADN de calidad y cantidad aceptable, a partir de muestras biológicas de tumor fresco y parafinas.

El aumento de ciclos en el programa del termociclador durante la técnica de PCR permitió una satisfactoria amplificación del ADN proveniente de parafina, debido a su baja calidad y exceso de inhibidores.

Las enzimas de restricción son una herramienta útil para la identificación de variantes genéticas a través de cortes precisos, que a su vez nos permiten la identificación de genotipos del gen en estudio.

RECOMEDACIONES

Dar continuidad a este tipo de trabajos para impulsar la investigación genética de enfermedades que afectan a la población ecuatoriana.

Ampliar el número de participantes en el estudio para futuras investigaciones sobre cáncer de tiroides.

Debido a que el cáncer es una enfermedad multigénica, se sugiere buscar nuevos genes candidatos como en la síntesis de hormonas, reparación y regulación celular.

Se propone para estudios posteriores con asociación de genes, elaborar haplotipos con el fin de obtener marcadores de susceptibilidad específicos para el cáncer de tiroides bien diferenciado.

Hacer un estudio del gen Tiroglobulina en población Ecuatoriana con el fin de conocer los genotipos propios de la población para los polimorfismos del mismo gen.

Debido a los resultados obtenidos en la cuantificación del ADN se recomienda utilizar muestras de tejido fresco para lograr mejores resultados en técnicas moleculares posteriores.

Realizar secuenciación de los genotipos como técnica de verificación de resultados.

Utilizar técnicas como re purificar el ADN extraído, diluir y cuantificar el mismo o incluir BSA a la extracción de ADN, si existe exceso de inhibidores que imposibilita la amplificación en PCR.

LISTA DE REFERENCIAS

- American Cancer Society. (2014). *las estadísticas claves sobre el cáncer de tiroides*. American Cancer Society.
- Arce, V. M., & Catalina, P. F. (2006). *Endocrinología*. Universidad Santiago de Compostela.
- Baas F, B. H. (1985). The human thyroglobulin gene: a polymorphic marker localized distal to C-MYC on chromosome 8 band q24. *Hum Genet.* 69(2), 138-43.
- Balbas, P. (2002). *De la biología molecular a la biotecnología*. Santiago de Chile: Trillas Sa De Cv.
- Ban, Y. G. (2003). Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100, 15119-15124.
- Ban, Y., Tozaki, T., Taniyama, M., Skrabanek, L., Nakano, Y., Ban, Y., & Hirano, T. (2012). Multiple SNp in intron 41 of Thyroglobulin Gene Are Associated with Autoimmune Thyroid Disease in the Japanese Population. *Plos ONE* 7 (5), 37501-37506.
- Brandan, N., Llanos, I. C., Rodríguez, A. N., & Ruiz Díaz, D. A. (1 de Enero de 2010). *Hormonas Tiroideas*. Obtenido de Hormonas Tiroideas : [http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/hormona%20tiroidea%202014\(1\).pdf](http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/hormona%20tiroidea%202014(1).pdf)
- Castaño, L., & Bilbao, J. (1997). Introducción a la biología molecular y la aplicación en la pediatría: Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. *An Esp Pediatr* 46, 305-310.
- Chandar, N. (2011). *Biología molecular y celular*. Estados unidos: Médica Panamericana,.
- Chiganer, G., & Ghersevich, S. (2011). Biología molecular en el cáncer de tiroides. *REV. MÉD. ROSARIO* 77, 147-156.
- Collins, J., Heward, J., Howson, J., Foxall, H., Carr-Smith, J., Franklyn, J., & Gough, C. (2004). Common allelic variants of exons 10, 12, and 33 of the thyroglobulin gene are not associated with autoimmune thyroid disease in the United Kingdom. *J. Clin. Endocr. Metab.* 89, 6336-6339.

- Cueva, P., & Yépez, J. (2009). *Epidemiología del Cáncer en Quito 2003-2005*. Quito: Solca Núcleo de Quito .
- Cueva, P., & Yépez, J. (2014). Epidemiología del cáncer en Quito 2006-2010. *Registro Nacional de Tumores*, 144-151.
- De Armas, Y., Capó, V., & González, E. (2006). Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. *REV ESP PATOL*, 171-174.
- De Groot LJ, E. L. (1995). Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2946-53.
- De Necochea, R., & Canul, J. C. (2004). Secuenciación de Ácidos nucleicos. *INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM*, 3-35.
- Eguiarte, L., & Souza, V. (2012). *Ecología Molecular* . México: Universidad Autónoma de México.
- Espinosa Asuar, L. (2011). *Ecología Molecular*. México: Universidad Autónoma de México.
- Fernández Sánchez, J. (2014). Clasificación TI-RADS de los nódulos tiroideos en base a una escala de puntuación modificada con respecto a los criterios ecográficos de malignidad. *Revista Argentina de Radiología*, 138-148.
- González, G. F. (1999). Dieta y cáncer de tiroides. *Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología*, 119-130.
- González, H., & Mosso, L. (2007). Cáncer Papilar de tiroides: Visión Actual. *Medicina Al día*, 87-91.
- Guyton, A. C. (1983). *Tratado de fisiología médica*. Madrid: Interamericana.
- Hemminki, k., & Shields, P. (2002). Skilled use of DNA polymorphisms as a tool for polygenic cancers. *Carcinogenesis.*, 379-380.
- Hu, J., Mohrenweiser, H., & Golden, D. (2002). Genetic polymorfisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol* 185, 64-73.
- López-Durán , M., Campo-Trapero , J., Cano-Sánchez , J., Díez-Pérez , R., & Bascones-Martínez , A. (2010). Application of molecular biology techniques in oral cancer. *Avances en Odontoestomatología Vol. 26* , 1-8.
- M, P. L. (2002). *Biología molecular y herencia*. Lima: Trillas.

- Marín , M. (2010). Principios básicos de la función tiroidea. *Facultad de Medicina de la Universidad Tecnológica de Pereira*, 50-52.
- Marín, J. G. (2010). *Genética Molecular principios y aplicaciones*. México: Plaza y Valdez.
- Matakidou A, H. N. (2004). Risk of non-medullary thyroid cancer influenced by polymorphic variation in the thyroglobulin gene. *Carcinogenesis.*, 25:369-73.
- Mendive , F., Rivolta, C., Moya, C., Vassart, G., & Targovnik, H. (2001). Genomic organization of the human thyroglobulin gene: the complete intron-exon structure. *Eur. J. Endocrinol* 145, 485- 496.
- Merino, T. (2007). *Web Gabriel Rada*. Obtenido de Web Gabriel Rada: <http://escuela.med.puc.cl/recursos/recepidem/indepi5.htm>
- Moretti, F. (2000). Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 517-39.
- Moya , C., Mendive, F., Rivolta, C., Vassart, G., & Targovnik, H. (2000). Genomic organization of the 5´region of human thyroglobulin gene. *Eur J, ENdocrinol.* 143, 789-798.
- National Cancer Institute. (2012). *La inversión de la nación en la investigación del cáncer*. USA: U.S. Department of ehealth and human services.
- National Cancer Institute . (2013). What you need to know about Thyroid Cancer. *National Cancer Institute at the National Institutes of Health*, 15-19.
- OMIM. (2014). THYROGLOBULIN; TG. *OMIM* .
- Parking, D., Whelan, S., Ferlay, J., Teppo, L., & Thomas, D. (2002). Cancer Incidence in Five continents. *IARC vol VIII*.
- PAZ Y MIÑO, C. (2000). *Manual de prácticas de genética molecular y citogenética humana*. Quito: Panamericana.
- Pérez de Castro, A. (2010). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) . *Uiversidad Politécnia de Valencia (ETSIAMN)*, 15-21.
- Pérez, G. (2006). *Polimorfismos genéticos y cáncer tiroideo*. España: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE ESPAÑA.

- Preston, M., Francheschi, S., Ron, E., & Negri, E. (2003). Thyroid cancer pooled analysis from 14 cases control studies. *Cancer causes control* 14, 787-789.
- Rentaría, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En V. S. Luis E. Eguiarte, *Ecología Molecular* (págs. 1-36). México: Instituto de Ecología, UNAM.
- Rey, S. (2012). *Patología de la glándula tiroides Texto y Atlas*. Madrid: Bubok.
- Rinaldi, S., & Franceschi, S. (2013). The Thyroid Cancer Working Group. *International Agency for Research on Cancer (IARC/WHO)*.
- Ron, E., & Modan, B. (1982). Etiología y Prevención del Cáncer. *Saunders*, 837-854.
- Ross, M. (2007). *Histología, Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular*. Madrid: Médica Panamericana, S.A.
- Rouvière, H., & Delmas, A. (2006). *Anatomía Humana: Descriptiva, topográfica y funcional*. España: Masson.
- Sandoval, B. (2014). Nódulo Tiroideo. *Metropolitano*.
- Satiesteban, P. (2006). Mecanismos Moleculares implicados en la función tiroidea, control de procesos fisiológicos y alteraciones patológicas. *Instituto de investigaciones Biomédicas*, 1-7.
- Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60., 73-76.
- Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM. (2008). Cáncer de tiroides. *Madrid*.
- Sócrates, A., Pavlov, S., & Clavero, F. (2010). Riesgo relativo y Odds ratio, ¿Qué son y cómo se interpretan? *REV. OBSTET. GINECOL. - HOSP. SANTIAGO ORIENTE DR. LUIS TISNÉ BROUSSE.*, 51-54.
- Suárez, M. (16 de Marzo de 2012). *Interaprendizaje de Probabilidades y Estadística Inferencial con Excel*. Obtenido de Interaprendizaje de Probabilidades y Estadística Inferencial con Excel: <http://docentesinnovadores.net/Archivos/5942/PRUEBA%20DE%20HIP%C3%93TESIS%20CON%20CHI%20CUADRADO%20EMPLEANDO%20EXCEL%20Y%20WINSTATS.pdf>
- Suh, Y., & Vijg, J. (2005). SNp's discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutat res.* 573 (1-2), 41-53.

- The International Agency for Research on Cancer. (2013). Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012. *Agency of the World Health Organization*, 1-3.
- The National Center for Biotechnology. (2014). *TG thyroglobulin [Homo sapiens (human)]*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7038>
- Thermo Scientific. (11 de Noviembre de 2014). *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer*. Obtenido de <http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>
- Ugarte, G. (2003). *Cáncer de tiroides en SOLCA 1991-2000: Estudio de resultados*. Ecuador: Revista “Medicina” Vol.9 N°3.
- Valadez , E., & Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. *Universidad Autónoma Chapingo.*, México.
- WATSON, J. (2005). *Biología molecular del gen*. Madrid España: Médica Panamericana.
- WHO, UNICEF, ICCDD. (1990). *Progress towards elimination of iodine deficiency disorders*. Geneva: World Health Organisation.
- Wilches , A. (2004). Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. *Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente de la URL* , 1-32.
- Yáñez, P. (2010). *Biometria y Bioestadística fundamentales*. Quito.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de autorización por parte de SOLCA Núcleo de Quito para tomar las muestras biológicas.

SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CANCER


Ecuador
NÚCLEO DE QUITO
Av. Eloy Alfaro y los Pinos
Telfs: 2419-775 / 2419-776 / 2419-778 / 2419-780
Casilla: 17-11-4965 C.C.I.

Nº 01361

OF. No. 205.14-P
Quito, 22 de julio/2014

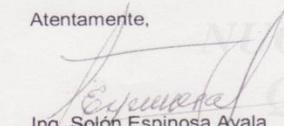
Señor M.D D.B
César Paz y Miño
**Decano del Instituto de Investigaciones Biomédica
Facultad de Ciencias de la Salud**

Presente.-

Hago referencia a su comunicación de fecha 10 de julio en el cual solicita autorización para que el Dr. Patricio Peralta tome muestras de tejido tumoral y sangre periférica de pacientes diagnosticados con cáncer de tiroides para el proyecto de investigación denominado: "Asociación de las variantes Ser734A/a y Arg1980Trp del gen tiroglobulina (TG) con el cáncer tiroideo en población ecuatoriana".

Al respecto tengo a bien indicarle que está autorizada su solicitud, el Dr. Peralta podrá colaborar con la investigación que se desarrollará en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Atentamente,


Ing. Soión Espinosa Ayala
Gral. Bríg. ®
**Presidente de SOLCA
Núcleo de Quito**



cc. Dirección Ejecutiva
Dirección Médica
Dr. Peralta
Docencia
Recursos Humanos

SEA/axc

Anexo 2. Carta de certificación de la realización del estudio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

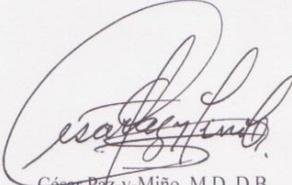
**Instituto de Investigaciones Biomédicas**
UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS
Laureate International Universities
Telf/Fax (593-2) 3340229 Mail: iib-udla@udla.edu.ec

Quito, julio 10, 2014

Ingeniera
Diana Calero
DIRECTORA DE BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES
Presente.-

Certifico que la señorita Natalia Carolina Peralta Vallejo estudiante de noveno semestre de la carrera Biotecnología de los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana realizará su tesis de grado con el tema "*Asociación de las variantes Ser734Ala y Arg1980Trp del gen tiroglobulina (TG) con el cáncer tiroideo bien diferenciado en la población ecuatoriana*". La cual se desarrollará en el Instituto bajo mi cargo como parte de la línea de investigación de éste centro de la Universidad de las Américas. Debo puntualizar que esta tesis es parte de un proyecto de investigación sobre cáncer, cuyos resultados son propiedad intelectual del instituto de Investigaciones Biomédicas, y parte de los mismos serán cedidos para dicha tesis como colaboración con su Universidad, así mismo nos comprometemos a que las posibles publicaciones y trabajos científicos que surjan de esta tesis se hará con los respectivos créditos a las dos instituciones colaboradoras.

Atentamente,


César Paz-y-Miño, M.D. D.B.
Decano del Instituto de
Investigaciones Biomédicas
Facultad de Ciencias de la Salud

Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Facultad de Ciencias de la Salud
Queri y Avd. Granados, Bloque 5, P-3
<http://iib.udla.edu.ec>

Anexo 3. Consentimiento informado – Información al paciente.



Instituto de Investigaciones Biomédicas

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS
Laureate International Universities

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Importancia:

Se conoce poco acerca de la etiología del cáncer en general y del tiroideo en particular debido a que es una enfermedad indolente, de buen pronóstico y baja morbi-mortalidad en comparación con otros tipos de cáncer. Además se considera que tienen una estrecha relación con el ambiente, la exposición a radiación electromagnética y a edades avanzadas.

La probabilidad de ser diagnosticado con cáncer de tiroides ha aumentado en los últimos años, la mayor parte de esto se debe al aumento de uso de ecografías de la tiroides, la cual puede detectar pequeños nódulos de tiroides que de otra manera no se hubiesen encontrado. Sin embargo, los estudios a nivel molecular son limitados en Ecuador a pesar de su alta especificidad y sensibilidad. El objetivo de este estudio es desarrollar nuevos métodos para el diagnóstico molecular oportuno de cáncer tiroideo que ganen confiabilidad y menor agresividad.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente debe ser mayor de edad. En casos en que el donante/paciente es menor de edad, los padres/tutores legales actuarán como personas responsables.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- El estudio derivado carece de carácter lucrativo y será financiado con fondos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad de las Américas (UDLA).
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Procedimiento para la obtención de muestra:

Para poder llevar a cabo este estudio, necesitamos que usted done voluntariamente una muestra de tejido tumoral y de sangre. En ningún caso se le realizarán intervenciones específicamente para este estudio. Como le mencionamos, las muestras que utilizaremos para este estudio se obtendrán a partir de las intervenciones programadas por su médico tratante y que usted necesita para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

El estudio para el que se solicita la donación voluntaria no acarrea ningún riesgo para donante/paciente.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de BACM en el teléfono: 23970000 o en el correo electrónico: iib-udla@udla.edu.ec

Anexo 4. Resultados de los genotipos para el exón 10.

Individuos	Tamaño del fragmento	Genotipo	
1	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
2	376	Homocigoto	Ser/Ser
3	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
4	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
5	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
6	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
7	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
8	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
9	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
10	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
11	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
12	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
13	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
14	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
15	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
16	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
17	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
18	376	Homocigoto	Ser/Ser
19	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
20	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
21	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
22	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
23	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
24	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
25	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
26	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
27	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
28	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
29	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
30	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
31	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala

32	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
33	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
34	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
35	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
36	376	Homocigoto	Ser/Ser
37	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
38	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
39	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
40	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
41	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
42	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
43	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
44	376	Homocigoto	Ser/Ser
45	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
46	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
47	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
48	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
49	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
50	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
51	376	Homocigoto	Ser/Ser
52	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
53	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
54	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
55	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
56	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
57	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
58	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
59	376	Homocigoto	Ser/Ser
60	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
61	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
62	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
63	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
64	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
65	376	Homocigoto	Ser/Ser
66	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
67	376	Homocigoto	Ser/Ser

68	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
69	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
70	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
71	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
72	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
73	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
74	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
75	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
76	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
77	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
78	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
79	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
80	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
81	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
82	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
83	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
84	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
85	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
86	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
87	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
88	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
89	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
90	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
91	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
92	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
93	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
94	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
95	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
96	281,95	Homocigoto	Ala/Ala
97	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
98	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
99	376,281,95	Heterocigoto	Ser/Ala
100	376	Homocigoto	Ser/Ser

Anexo 5. Resultados de los genotipos para el exón 33.

Individuo	Tamaño del Fragmento	Genotipo	
1	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
2	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
3	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
4	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
5	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
6	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
7	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
8	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
9	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
10	324	Homocigoto	Trp/Trp
11	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
12	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
13	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
14	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
15	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
16	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
17	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
18	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
19	324	Homocigoto	Trp/Trp
20	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
21	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
22	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
23	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
24	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
25	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
26	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
27	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
28	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
29	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
30	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
31	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
32	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
33	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
34	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
35	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
36	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
37	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
38	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
39	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
40	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
41	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
42	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
43	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp

44	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
45	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
46	324	Homocigoto	Trp/Trp
47	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
48	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
49	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
50	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
51	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
52	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
53	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
54	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
55	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
56	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
57	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
58	324	Homocigoto	Trp/Trp
59	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
60	324	Homocigoto	Trp/Trp
61	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
62	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
63	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
64	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
65	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
66	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
67	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
68	324	Homocigoto	Trp/Trp
69	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
70	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
71	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
72	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
73	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
74	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
75	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
76	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
77	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
78	324	Homocigoto	Trp/Trp
79	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
80	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
81	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
82	324	Homocigoto	Trp/Trp
83	324	Homocigoto	Trp/Trp
84	324	Homocigoto	Trp/Trp
85	324	Homocigoto	Trp/Trp
86	324	Homocigoto	Trp/Trp
87	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
88	324	Homocigoto	Trp/Trp
89	324	Homocigoto	Trp/Trp

90	324	Homocigoto	Trp/Trp
91	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
92	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
93	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
94	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
95	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
96	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp
97	324	Homocigoto	Trp/Trp
98	324	Homocigoto	Trp/Trp
99	324	Homocigoto	Trp/Trp
100	324,148,176	Heterocigoto	Arg/Trp

Anexo 6. Kit de extracción de ADN



Anexo 7. Técnica de extracción de ADN



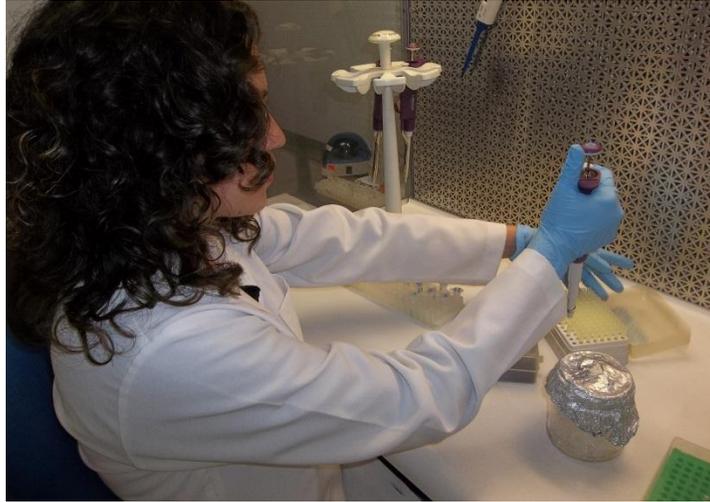
Anexo 8. Muestra de tumor de Tiroides fresca



Anexo 9. Bloques de parafina de tumores de tiroides



Anexo 10. Técnica de PCR



Anexo 11. Elaboración de electroforesis en gel de agarosa

