



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Estandarización de los protocolos para determinar las características cariotípicas y daño al ADN en células de cáncer de tiroides mediante cariotipaje y ensayo cometa.

Morillo Balcázar, Andrea Estefanía

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología

Torres Arias, Marbel, Ph.D

14 de Octubre de 2020

Document Information

Analyzed document	perfil titulacion Morillo_Andrea.pdf (D81348483)
Submitted	10/12/2020 7:53:00 AM
Submitted by	Marbel
Submitter email	mmtorres@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	mmtorres.espe@analysis.arkund.com



Sources included in the report

W	URL: https://core.ac.uk/download/pdf/55519493.pdf Fetched: 5/29/2020 10:43:01 PM	2
SA	Citogenética. Piedra, Plaza.docx Document Citogenética. Piedra, Plaza.docx (D67841022)	1
W	URL: https://www.researchgate.net/publication/287201949_Genetica_Toxicologica_y_Carcino ... Fetched: 8/1/2020 11:43:17 PM	3



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Estandarización de los protocolos para determinar las características cariotípicas y daño al ADN en células de cáncer de tiroides mediante cariotipaje y ensayo cometa ”**, fue realizado por el señorita **Morillo Balcázar Andrea Estefanía** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de Octubre de 2020.



Firmado electrónicamente por:

**MARBEL
TORRES**

Torres Arias Marbel, PhD.

C. C: 1802949154



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Morillo Balcázar Andrea Estefanía**, con cédula de ciudadanía n° 1721227260, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Estandarización de los protocolos para determinar las características cariotípicas y daño al ADN en células de cáncer de tiroides mediante cariotipaje y ensayo cometa”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 14 de octubre de 2020.



Morillo Balcázar Andrea Estefanía

C.C.: 1721227260



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Morillo Balcázar Andrea Estefanía**, con cédula de ciudadanía n° 1721227260, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Estandarización de los protocolos para determinar las características cariotípicas y daño al ADN en células de cáncer de tiroides mediante cariotipaje y ensayo cometa”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 14 de octubre de 2020.

Morillo Balcázar Andrea Estefanía

C.C.: 1721227260

Dedicatoria

A mis padres, Jorge Morillo y Celia Balcázar

A mis hermanos, Carolina y Jorge Luis

A mi sobrino y cuñado, Gianluca y Andrés

A mi tío, Mario Moncayo

Andrea Estefanía Morillo Balcazar

Agradecimientos

A mis padres Jorge y Conchita, por todo su apoyo y comprensión, por todo su amor incondicional, esfuerzo y dedicación a lo largo de este camino. Por enseñarme todos los valores y principios que me hicieron la persona que soy hoy en día.

A mis hermanos, Carolina y Jorge, por creer en mí y estar presente en todo momento, por los momentos buenos y malos, pero sobre todo por las alegrías. Por ser un ejemplo para mí en todos los aspectos.

A mi tía Marta, por ser mi apoyo incondicional en todo momento, por creer en mi y acompañarme, para estar siempre para todo.

A mis primos, Marcelo, Alex, Wendy, Diana y Mario por guiarme en mis estudios, por apoyarme en cada decisión y ser una fuente de inspiración.

A Marbel Torres Ph.D por guiarme, por su confianza, ayuda y tiempo, por compartir su conocimiento y darme su apoyo para realizar mi proyecto de titulación. Por creer en mi y en mi proyecto.

A Cesar Paz y Miño por permitirme formar parte del Centro de Investigación Genética y Genómica.

A Santiago Guerrero y Patricia Guevara, por guiarme dentro del laboratorio y compartir su conocimiento conmigo.

A la familia CIGG: Sebas, David, Andre, Lu, Daniel, Cami, Paty y Lore, por su ayuda, colaboración y experiencias compartidas.

A mis amigas, Belén y Kathya, por ser un apoyo incondicional en todo momento, ser su amiga sin duda alguna fue una de las cosas más bonitas de la universidad.

A mis amigas, Diana, Ariel y Andrea por estar presentes siempre, por su apoyo y constancia, para siempre y por siempre.

A mis amigos Andrea, Elio, Berenice, Luis David, Yasmin, Angy, Esteban, Abi, Sebas, Alejandro y Carla por estar siempre presente, por ayudarnos siempre, por todos los momentos buenos y malos, por sus consejos, por todos los viajes, son los mejores amigos que la universidad me puedo dar.

Índice de contenidos

CERTIFICACIÓN	3
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	9
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
Lista de Abreviaturas.....	16
Resumen.....	18
Abstract	19
Capítulo I: Introducción.....	20
Antecedentes	20
Justificación del problema	22
Objetivos del proyecto	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
Capítulo II: Revisión Bibliográfica.....	26
Tiroides.....	26
Tirocitos.....	27
Función de la glándula tiroides	28
Enfermedades de la glándula tiroides.....	29

	10
Disruptores endocrinos	30
Cáncer	31
Clasificación del cáncer	31
Cáncer de tiroides	32
Diagnóstico ecográfico del nódulo tiroideo	34
Biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF).....	35
Ensayo Cometa.....	38
Citogenética	39
Fitohemaglutinina	42
Tipos de bandeado cromosómico	42
Cariotipo.....	44
Etiología del cáncer de tiroides	49
Genética del cáncer de tiroides.....	50
Capitulo III: Materiales y Métodos.....	52
Localización Geográfica.....	52
Preparación de medio de cultivo	52
Cultivo de muestra	52
Cosecha de cultivo de sangre periférica	53
Cosecha de cultivo.....	53
Choque Hipotónico	53

	11
Fijador de Carnoy	54
Bandeo GTG de cromosomas	56
Ensayo cometa	58
Preparación de placas	58
Preparación de la muestra	58
Búsqueda bibliográfica de variantes genéticas en cáncer de tiroides.	62
Capítulo III: Resultados.....	63
Cariotipo.....	63
Ensayo cometa	71
Revisión bibliografica sobre variantes geneticas del cancer de tiroides.	76
Capítulo V: Discusión.....	79
Capítulo VI: Conclusiones.....	89
Capítulo VII: Recomendaciones	90
Referencias.....	91
Anexos.....	104

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Preparación de Choque Hipótonoco (KCl 0.54%)</i>	54
Tabla 2. <i>Preparación de Fijador de Carnoy (3:1)</i>	55
Tabla 3. <i>Soluciones usadas para Bando GTG de cromosomas.</i>	56
Tabla 4. <i>Preparación de muestras con H₂O₂ al 10%</i>	59
Tabla 5. <i>Preparación de muestras con H₂O₂ y LMP</i>	59
Tabla 6. <i>Variaciones en el tiempo de Colcemid</i>	63
Tabla 7. <i>Tiempos en solución tripsina (1:250) y en tinción Giemsa</i>	65
Tabla 8. <i>Tinción y bando de muestras de sangre periférica.</i>	67
Tabla 9. <i>Condiciones del ensayo cometa con variación en capas de NMP.</i>	72
Tabla 10. <i>Condiciones 2, ensayo cometa variación de capas de agarosa NMP y LMP</i>	73
Tabla 11. <i>Condiciones del ensayo cometa con 1 capa de agarosa NMP.</i>	74
Tabla 12. <i>Revisión bibliográfica de variantes genéticas en el cáncer de tiroides.</i>	77

Índice de figuras

Figura 1. <i>Prevalencia del cáncer en las provincias del Ecuador (2001-2016)</i>	21
Figura 2. <i>Estructura de la glándula tiroides, vista frontal y lateral</i>	26
Figura 3. <i>Tiroides normal, corte transversal y longitudinal</i>	27
Figura 4. <i>Célula Tiroidea</i>	28
Figura 5. <i>Tipos de cáncer de tiroides y su origen</i>	33
Figura 6. <i>A) Ecografía de tiroides extendida B) Tiroides normal, lóbulos tiroides (*), músculos infrahioideos (→), C carótida, T tráquea, Y yugular</i>	34
Figura 7. <i>Biopsia por aspiración de aguja fina de un nódulo de tiroides</i>	36
Figura 8. <i>Algoritmo de diagnóstico de un nódulo tiroideo</i>	37
Figura 9. <i>Células con daño en el ADN, detectado a través del ensayo cometa</i>	38
Figura 10. <i>Fotografía original de Tijo y Levan donde establecen que el hombre tenía 46 cromosomas</i>	39
Figura 11. <i>Los padres de la citogenética: Theophilus S. Paiter y su cariotipo donde se muestra el cromosoma Y. Levan y Tijo, determinaron el número de cromosomas humanos, Lejeune determino la primera aberración cromosómica en el síndrome de Down</i>	40
Figura 12. <i>Cromosomas 7, 21 y 22 con tinción de bandas R, Q y G</i>	43
Figura 13. <i>Clasificación morfológica de los cromosomas según la posición del centrómero según Levan et al. 1964</i>	44
Figura 14. <i>Cariotipo normal clasificado en los 7 grupos y el par de cromosomas sexuales (Femenino)</i>	46
Figura 15. <i>Metafase tratada con 5' azacitidina, las flechas indican sitios con fragilidad cromosómica</i>	47

Figura 16. <i>Cariotipo femenino normal, paciente de 60 años.</i>	48
Figura 17. <i>Marcadores moleculares del cáncer de tiroides</i>	50
Figura 18. <i>Variantes genéticas del cáncer de tiroides y sus porcentajes</i>	51
Figura 19. <i>Esquema ensayo cometa</i>	61
Figura 20. <i>A) Se observa una metafase con buena dispersión, cromosomas con una buena morfología, largos y definidos (tiempo de colcemid, 40 min); B) Metafase con cromosomas largos y no definidos (tiempo de colcemid, 25 min); C) Metafase con cromosomas superpuestos (tiempo de colcemid, 25 min).</i>	64
Figura 21. <i>A) Metafase con cromosomas cortos y presencia de ruido (tiempo de colcemid, 1 h); B) Metafase con cromosomas gruesos, superpuestos y no definidos (tiempo de colcemid, 1 h).</i>	64
Figura 22. <i>A) Cromosomas con bandas no definidas y gruesas; B) Metafase con superpuestos con bandas con bajo contraste; C) Metafase con cromosomas quemados.</i>	66
Figura 23. <i>Metafases con 43 s en solución tripsina, A) 2.40 min en tinción Giemsa, B) 2.30 min en tinción Giemsa y C) 2 min en tinción Giemsa.</i>	66
Figura 24. <i>A) Metafase con 45.5 s en tripsina y 2.50 min en tinción Giemsa; B) Metafase con 42 s en tripsina y 3 min en tinción Giemsa; C) Metafase en 44.5 s en tripsina y 3 min en tinción Giemsa; D) Metafase con más de 46 cromosomas; E) Metafase superpuesta con más de 46 cromosomas y cromosomas superpuestos.</i>	68
Figura 25. <i>A) Se observa un cariotipo normal femenino con 46 cromosomas (46 XX) con un tiempo en solución tripsina 43 s y tinción Giemsa 2.45 min; B) Cariotipo femenino con 46 cromosomas (46XX), con un tiempo en solución tripsina 44.7 s y tinción Giemsa 2.40 min.</i>	69

- Figura 26.** A) Cariotipo femenino, con anomalía numérica presenta 44 XX, -19, -20 con un tiempo en solución tripsina 43 s y tinción Giemsa 3 min, B) Cariotipo masculino, con anomalías numéricas presenta 45 XY, -18. con un tiempo en solución tripsina 44.5 s y tinción Giemsa 3 min. 70
- Figura 27.** Cariotipo masculino con anomalías numéricas, presenta 36 cromosomas (XXYYY), -1, -2, -3, -6, -7, -8, -14, -16, -17, -18, -19, -20, -21. El tiempo en solución de tripsina fue de 44 s y en tinción Giemsa fue de 2.40 s. 71
- Figura 28.** Células con presencia de halo, variación del tampón de lisis 74
- Figura 29.** Células con presencia de halo, variación de condiciones de electroforesis. A) Condiciones de electroforesis 25V, 300 mA y 20 min; B) Condiciones de electroforesis 25V, 300 mA y 30 min. 75
- Figura 30.** Células con presencia de halo y cola. 76

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
BAAF	Biopsia por aspiración con aguja fina
cm	Centímetros
°C	Celsius
DMSO	Dimetil sulfóxido
g	Gramos
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
INEC	Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos
LMP	Agarosa de punto bajo de fusión
mA	Miliamperios
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	Minutos
NMP	Agarosa de punto medio de fusión
NCI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBS	Buffer fosfato salino
pH	Potencial de hidrógeno
PTC	Cáncer de tiroides papilar
RMPI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Revoluciones por minutos
s	Segundos
μL	Microlitros
T3	Triyodothyronine
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA

Resumen

El cáncer de tiroides es la enfermedad más común del sistema endocrino. Según las estimaciones actuales, el cáncer de tiroides es el octavo cáncer diagnosticado con más frecuencia entre las mujeres en todo el mundo. La investigación sobre el tratamiento del cáncer es esencial para mejorar la vida de los pacientes afectados por esta enfermedad. El cáncer de tiroides se puede detectar mediante examen físico, química sanguínea, BAAF, ecografía de tiroides y exámenes genéticos. Actualmente hay pocos estudios sobre el cariotipo del cáncer de tiroides en el país, la estandarización del protocolo permitido determinar que el tiempo de incubación cortos producen cromosomas largos y no definidos y tiempos de incubación largos producen cromosomas cortos y grueso, el tiempo de exposición a tripsina es un punto clave en el bando GTG, ya que de eso depende la calidad de bandas obtenidas. El ensayo cometa permite determinar el daño en el ADN, es un ensayo rápido, sensible y de bajo costo. Se estableció un protocolo para determinar la genotoxicidad en el ADN mediante el ensayo cometa, se determinaron variantes que permiten un ensayo confiable y reproducible. Se estudiaron bibliográficamente variantes genéticas del cáncer de tiroides, estas variantes permiten establecer nuevas dianas terapéuticas, sin embargo, el cáncer de tiroides permanece prácticamente inexplorado en cuanto a la posible influencia de variantes genéticas en su incidencia.

Palabras clave:

- **ENSAYO COMETA**
- **CARIOTIPO**
- **VARIANTES GENÉTICAS**

Abstract

Thyroid cancer is the most common disease of the endocrine system. According to current estimates, thyroid cancer is the eighth most frequently diagnosed cancer among women worldwide. Research on cancer treatment is essential to improve the lives of patients affected by this disease. Thyroid cancer can be detected by physical exam, blood chemistry, BAAF, thyroid ultrasound, and genetic tests. Currently there are few studies on the karyotype of thyroid cancer in the country, the standardization of the protocol allowed to determine that the short incubation time produces long and undefined chromosomes and long incubation times produce short and thick chromosomes, the time of exposure to trypsin It is a key point in the GTG side, since the quality of the bands obtained depends on that. The comet assay allows the determination of DNA damage, it is a rapid, sensitive and inexpensive assay. A protocol was established to determine genotoxicity in DNA through the comet assay, variants were determined that allow a reliable and reproducible assay. Genetic variants of thyroid cancer were studied in the literature. These variants allow establishing new therapeutic targets, however, thyroid cancer remains practically unexplored in terms of the possible influence of genetic variants on its incidence.

Key words:

- **THYROID CANCER**
- **ASSAY COMET**
- **KARYOTYPE**
- **GENETIC VARIANTS**

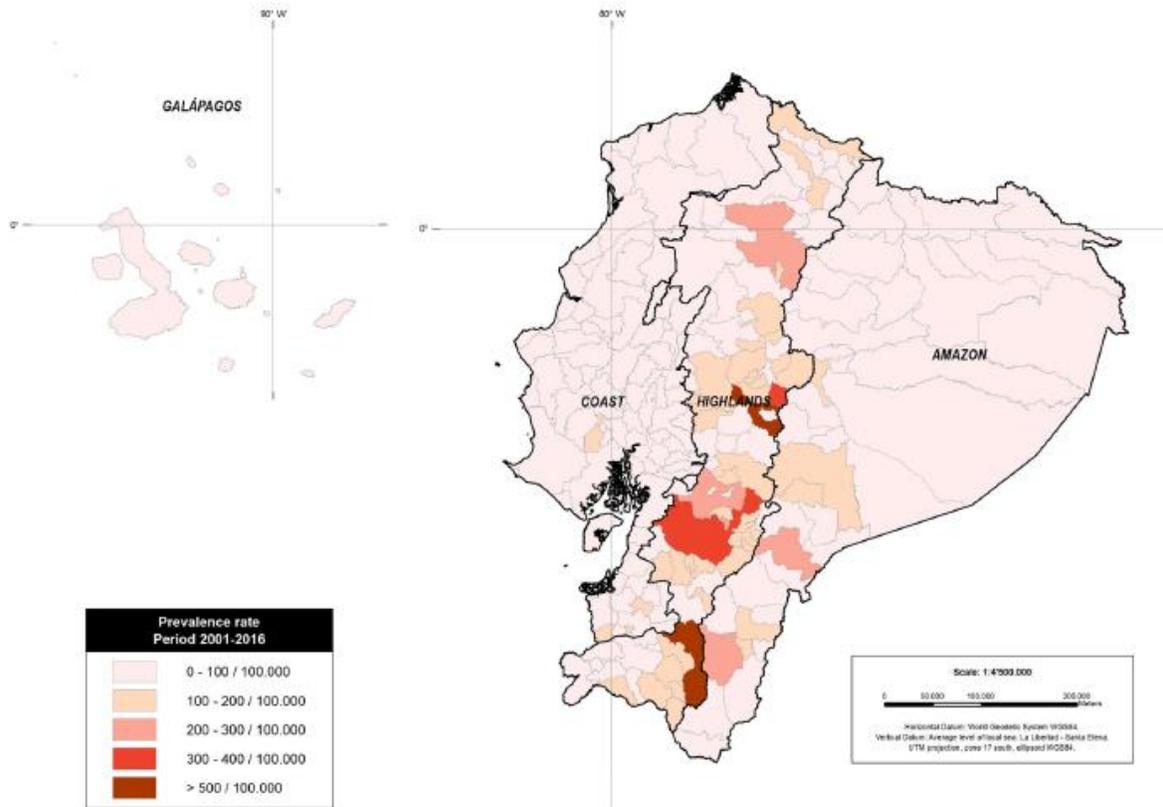
Capítulo I: Introducción

Antecedentes

En Ecuador la tasa de incidencia de Cáncer es de 165 casos por 100 000 habitantes según datos proporcionados por The Global Cancer Observatory perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta enfermedad continúa progresando alarmantemente en el mundo con 1,8 millones de nuevos casos y alrededor de 9,5 millones de decesos estimados en el 2018, según datos publicados por GloboCan. De acuerdo con datos del Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos (INEC), el carcinoma de tiroides tiene una incidencia de 19% en el país, 40,9% son mujeres. En Quito este es el cáncer que más afecta a la población femenina, con una frecuencia del 16.4%, en mujeres de edades entre 50 y 60 años (Cueva, Yépez, & Tapuri, 2559).

Los países de Latinoamérica se enfrentan a un gran reto en promover la detección temprana y oportuna para reducir la proporción de casos detectados en fases tardías cuando la probabilidad de supervivencia es más baja y su tratamiento es más caro e invasivos (Knaul et al., 2009).

Según las estimaciones actuales, el cáncer de tiroides es el octavo cáncer diagnosticado con más frecuencia entre las mujeres en todo el mundo (J. Rodríguez, Boffill, & Rodríguez, 2016). En las últimas décadas, la incidencia de este cáncer ha aumentado constantemente en algunos países de Europa, América y Asia. (Sierra, Soerjomataram, & Forman, 2016) En Ecuador, se reportaron 23,632 hospitalizaciones en 16 años (2001-2016), resultando en 1,539 muertes por cáncer de tiroides. Salazar et al., (2019), menciona que Ecuador tiene una de las tasas más altas de cáncer de tiroides en América Latina como se observa en la siguiente figura 1.

Figura 1.*Prevalencia del cáncer en las provincias del Ecuador (2001-2016)*

Nota: tomado de Salazar, (2019)

El carcinoma papilar de tiroides (PTC) es el tipo más común de cáncer de tiroides, seguido del carcinoma folicular, el carcinoma medular, el carcinoma poco diferenciado y el carcinoma anaplásico (Cha & Koo, 2016). La mayoría de los cánceres requieren tiroidectomía. El tratamiento después una tiroidectomía depende de la etapa en la cual este el cáncer. El tratamiento con yodo radioactivo (RAI) se puede usar en cáncer que se manifiestan sus síntomas tempranos y avanzados: Triyodothyronine (T3) o tetrametiltiroxina (tiroxine T4). Si el cáncer reaparece, usa radioterapia de haz externo, terapia dirigida o quimioterapia (Malheiros, Canberk, Poller, & Schmitt, 2018).

La investigación sobre el tratamiento del cáncer es esencial para mejorar la eficacia de los pacientes afectados por esta enfermedad. El cáncer de tiroides y su tratamiento pueden producir síntomas y efectos secundarios, así como también efectos emocionales, sociales y económicos. (Chala, Pava, Franco, Álvarez, & Franco, 2013). A nivel molecular, el análisis citogenético de los tumores malignos es importante para el diagnóstico y el pronóstico de esta enfermedad. El análisis de cariotipo permite el establecimiento de anomalías digitales y estructurales en la asignación final digital de cada paciente (Hwang et al., 2013).

Actualmente hay pocos estudios sobre el cariotipo del cáncer de tiroides en el país. Esto ayudará a determinar si los pacientes ecuatorianos con este tumor tienen anomalías. Además, en comparación con otras tecnologías (como HPLC), la prueba del cometa puede detectar de manera eficiente y precisa el daño genético y reparar en moléculas de ADN altamente densas (Chiganer, Ghersevich, Sánchez, & Novelli, 2011), la elución alcalina y sedimentación de nucleoides también son ensayos que se usan pero no son eficaces (Montes, Montero, Moreno-Rosi, & Gonzáles, 2011). El ensayo cometa es una herramienta básica para el daño y la reparación del ADN, puede detectar varios daños en el ADN de pacientes con cáncer con alta sensibilidad. (Zúñiga Venegas, 2009).

Justificación del problema

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo y la segunda causa de muerte en el país. Según datos de la OMS en 2015, el incidente causó 8,8 millones de muertes (Álvarez Montané, 2014). El aumento de la enfermedad se atribuye al crecimiento de la población, el envejecimiento de la población y la evolución de los factores de riesgo, tales como: obesidad, tabaquismo, falta de actividad física y dieta insuficiente.

La incidencia del cáncer de tiroides esta aumentado drásticamente en los últimos años. Roman et al., (2017), en su investigación menciona que esto se debe a que muchos de los pacientes que sufren esta enfermedad no se realizan biopsias agresivas o cirugías extensivas y se evita a toda costa un tratamiento agresivo. Así, Ecuador tiene una de las tasas más altas de cáncer de tiroides en América Latina, Salazar-Vega et al, (2019), en su investigación menciona que Ecuador ocupa el primer lugar entre mujeres de América Latina con esta enfermedad.

Aunque la tasa de mortalidad es baja, esta es una neoplasia frecuente y se necesita realizar un análisis más detallado de sus variantes patológicas, estado cromosómico, daño al ADN y efectividad de tratamiento para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad respecto al diagnóstico y tratamiento (Hercbergs, 2019).

En pacientes con neoplasias en la tiroides se presentan además de los cambios físicos y estéticos, cambios hormonales y psicológicos que derivan de la deficiencia hormonal que causa la extracción de este órgano, y se recurre a diversos tratamientos para suplir las funciones de la glándula tiroidea; lo que causa un problema a nivel económico, social y psicológico afectando a su calidad de vida (Novoa Gómez, Vargas Gutiérrez, Obispo Castellanos, Pertuz Vergara, & Rivera Pradilla, 2010).

Investigaciones realizadas en el país, (Guerrero et al., 2018), mencionan que la población ecuatoriana posee una gran diversidad genética, con una contribución tri-híbrida: nativos americanos (51%), europeos (33%) y africanos (13%). En los últimos años se han demostrado que la raza o etnia tiene un impacto en la incidencia del cáncer, la respuesta a medicamentos, el perfil genético y la supervivencia. Así, es posible que la población ecuatoriana presente un daño cromosómico diferente al de otras poblaciones.

Las anomalías cromosómicas son abundantes en varios tipos de cáncer y predecir resultados clínicos basados en datos cromosómicos es mucho mejor en base a datos de secuenciación de ADN (Jiang et al., 2017). Estos ensayos son necesarios sus resultados nos permitirán entender el estado en el que se encuentra el cáncer de tiroides en el país, respecto al cariotipo y el daño en el ADN, ya que es necesario administrar un tratamiento con pautas actuales.

Un diagnóstico temprano seguido de un tratamiento oportuno permite una recuperación de más del 50% de casos de cáncer en general; un claro ejemplo es el cáncer papilar de tiroides detectado en estadios temprano tiene un porcentaje de recuperación del 100% y el cáncer de mama un porcentaje mayor del 95% (Zaharia, 2013). La investigación del tratamiento de cáncer es fundamental para mejorar los efectos en pacientes afectados por la enfermedad, el cáncer de tiroides y su tratamiento producen síntomas y efectos secundarios físicos, así como efectos emocionales, sociales y económicos (Chala et al., 2013).

El cáncer sigue siendo en la actualidad un problema de salud pública a nivel mundial, es una enfermedad con una de las tasas más altas de mortalidad, a pesar de que existen varias investigaciones y estudios en curso no se ha logrado disminuir las consecuencias y complicaciones que este enfermedad genera (Cajamarca-Barón, 2014).

El cáncer tiroideo es la primera causa de neoplasias en el sistema endocrino, recientemente existen avances en su diagnóstico, causas y la biología molecular de esta enfermedad; un mejor diagnóstico implica un tratamiento eficaz, local y sistemático (Díez et al., 2016). La mayoría de cánceres se diagnostican por que el paciente acude a consulta por molestias o síntomas, la detección de nódulos en muchas ocasiones se da por un examen médico de rutina y es confirmado con análisis de sangre, ecografía de la tiroides, biopsia por punción de aguja fina y pruebas genéticas (Ramírez, Guzmán, & Vidal, 2009).

En el cáncer de tiroides se identifica la mutación de un proto oncogén, *RET*, lo cual permitirá realizar estudios genéticos para identificar personas susceptibles de padecer un carcinoma medular o un carcinoma diferenciado de la glándula tiroides en etapas iniciales permitiendo un tratamiento efectivo (Navarro, 2012).

Objetivos del proyecto

Objetivo general

Estandarización de los protocolos para determinar las características cariotípicas y daño al ADN en células de cáncer de tiroides mediante cariotipaje y ensayo cometa.

Objetivos específicos

- Estandarizar el protocolo de cariotipaje para obtener el cariotipo de células de cáncer de tiroides.
- Diseñar un protocolo para determinar la genotoxicidad en el ADN en células mediante ensayos Cometa.
- Buscar variantes genéticas en cáncer de tiroides a nivel mundial

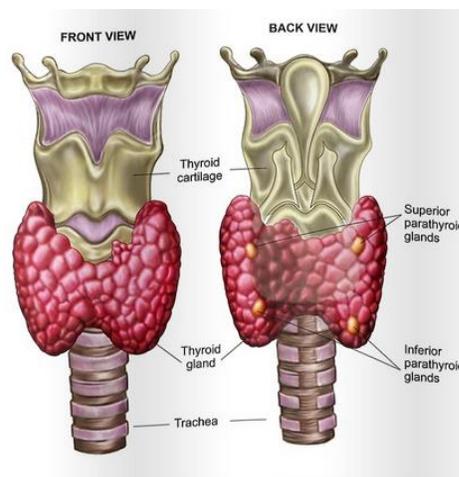
Capítulo II: Revisión Bibliográfica

Tiroides

La tiroides es uno de los órganos endocrinos de mayor tamaño, es de color gris-rosado y está compuesta por dos lóbulos que asemejan las alas de una mariposa (Figura 2), se encuentra en el cuello en la parte anterior e inferior, por delante de la tráquea cervical (Martín, 2016). Los lóbulos derecho e izquierdo están compuestos por el istmo, hay dos pares de glándulas paratiroides en la cara posterior de los lóbulos o de bajo de ellos.

La glándula se compone de un estroma conjuntivo con una cubierta delgada y continua, está formada por un tejido propio, representado por pequeñas masas morfológicas equivalentes o también llamados folículos tiroideos (Roman, 2017). Es la glándula endocrina más grande de nuestro organismo su característica principal es la producción de hormonas, las células foliculares de la glándula producen 2 hormonas tiroideas principales: T3 y T4, estas juegan un papel esencial en la regulación de la función celular durante el crecimiento, desarrollo y metabolismo (Gionfra et al., 2019).

Figura 2.
Estructura de la glándula tiroides, vista frontal y lateral



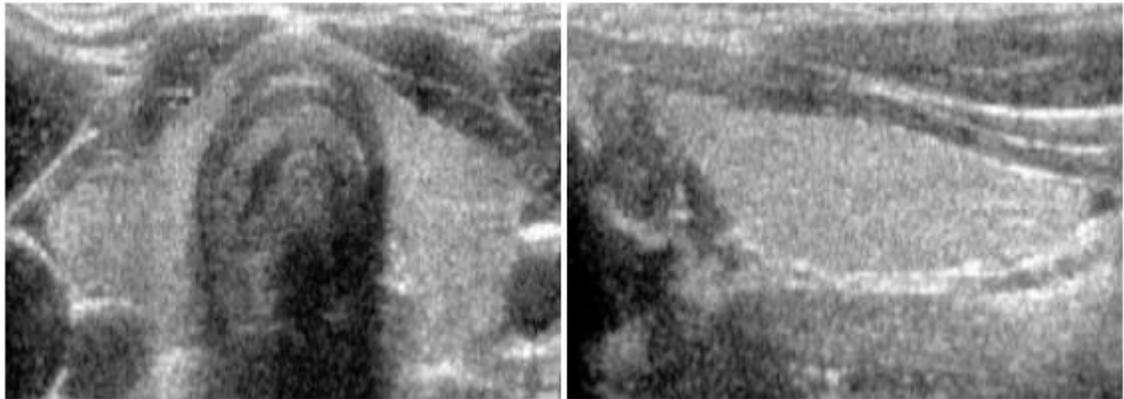
Nota: tomado de Uhliarova et al (2018).

Se sitúa por delante de la vía respiratoria apoyada en la tráquea y debajo de la laringe, es una glándula blanda y friable, se encuentra muy vascularizada por dos arterias: arteria tiroidea superior y la arteria tiroidea inferior (Martín, 2016). La tiroides es la glándula endocrina que almacena grandes cantidades de hormonas, un aspecto importante para la homeostasis hormonal (Brandan, Llanos, Horak, Tannuri, & Rodríguez, 2014).

La glándula tiroidea está en relación anatómica con dos nervios laríngeos; el nervio laríngeo superior y el recurrente (Fernández, 2019). El tamaño de esta glándula varía entre mujeres y hombres, en adultos puede llegar a medir de 40 a 60 mm de longitud y de 13 a 18 mm de diámetro y normalmente pesa 20gr.

Figura 3.

Tiroides normal, corte transversal y longitudinal.



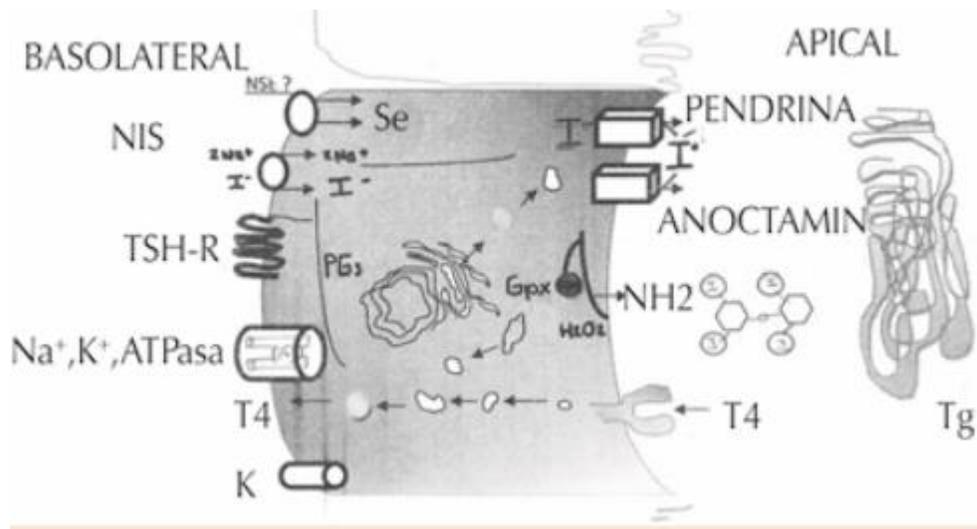
Nota: tomado de Arancinia et. al (2002).

Tirocitos

En la glándula tiroides, su unidad estructural es el folículo que está constituido por una capa de células epiteliales de forma cúbica llamadas tirocitos, se encuentran alrededor de una solución coloidal viscosa que es secretada por los tirocitos (Herrera & Bernal, 2008).

Los tirocitos presentan una cara apical que se encuentra en contacto con la solución coloide y su cara basal que está orientada hacia el exterior del folículo (Brandan et al., 2014). Los tirocitos en su membrana tienen varias estructuras y enzimas intracelulares (Figura 3), que permiten la síntesis y la liberación de las hormonas tiroideas (García, 2016).

Figura 4.
Célula Tiroidea



Nota: tomado de García (2016).

Función de la glándula tiroides

La tiroides es esencial para el desarrollo, el crecimiento y el metabolismo normales de prácticamente todos los tejidos humanos. Su papel fundamental en el metabolismo cardíaco, cerebral, óseo y general queda ilustrado por las manifestaciones clínicas de la enfermedad tiroidea, que afecta hasta al 10% de la población (Ramos, 2015).

Los niveles bajos de TH sérica en el hipotiroidismo dan como resultado un aumento de la liberación de hormona estimulante de la tiroides (TSH) por parte de la hipófisis, bajo la influencia de la hormona liberadora de tirotrópina hipotalámica (TRH) y puede provocar aumento de peso, colesterol alto, disfunción cognitiva, depresión e intolerancia al frío (Martínez Díaz-Guerra, Serraclara Pla, Jódar Gimeno, & Hawkins Carranza, 2008), mientras que el hipertiroidismo, es decir cuando los niveles de TH circulantes son altos, como se inhibe la síntesis y secreción de TRH y TSH, pudiendo provocar pérdida de peso, taquicardia, fibrilación auricular y osteoporosis. Una variación leve en la función tiroidea, tanto subclínica como dentro del rango normal, también se asocia con estos resultados clínicos relacionados con la TH (J. Rodríguez et al., 2016).

Las diferencias sexuales en la regulación de la función tiroidea generalmente se han relacionado con la influencia de las hormonas sexuales y la enfermedad tiroidea autoinmune, lo que resulta en una mayor prevalencia de disfunción tiroidea en las mujeres, sin una comprensión clara de los mecanismos moleculares subyacentes (Becerra & Bautista, 2020).

Enfermedades de la glándula tiroides

Se sabe que los trastornos de la hormona tiroidea alteran el eje reproductivo en los hombres. En el hipertiroidismo de inicio en la edad adulta, las gonadotropinas a menudo están dentro del rango normal, mientras que la SHBG (globulina fijadora de hormonas sexuales) está invariablemente elevada (Galofré, Pineda, Toni, & Anda, 2016).

En el hipertiroidismo masculino, el aumento de SHBG conduce a un aumento en los niveles de tT circulante. Sin embargo, el fT generalmente no se ve afectado.

En nuestros sujetos, todas las hormonas reproductivas estaban dentro o muy cerca del rango de referencia, a pesar de que se observaron fluctuaciones consistentes con la normalización de las hormonas tiroideas. Estos cambios pueden haber afectado las fracciones libres / unidas y las proporciones de andrógenos / estrógenos (Anda, Pineda, Toni, & Galofré, 2016).

El hipotiroidismo afecta del 4% al 10% de las mujeres y aumenta con la edad. Los síntomas, que a menudo son inespecíficos y sutiles, pueden incluir: letargo, aumento de peso leve, edema, intolerancia al frío, estreñimiento, deterioro mental, piel seca, depresión, menstruación irregular, ronquera, mialgias, hiperlipidemia y bradicardia. La determinación de TSH suele estar justificada cuando algunos de estos están presentes (Pineda, Galofré, Toni, & Anda, 2016).

Disruptores endocrinos

Las hormonas T3 y T4 son de vital importancia para el desarrollo del cerebro. Por lo tanto, la preocupación real es que una gran cantidad de sustancias químicas que se encuentran comúnmente en el medio ambiente y en muestras de tejidos humanos y silvestres pueden dañar la función tiroidea. Estos productos químicos van desde compuestos naturales hasta compuestos artificiales. Cuando falta yodo en la dieta (como el yodo), o cuando está presente en la dieta (como la sulfamida), pueden causar disfunción tiroidea (Zoeller et al., 2002).

La evidencia clínica reciente sugiere fuertemente que el desarrollo del cerebro es mucho más sensible al exceso o al déficit de la hormona tiroidea de lo que se creía anteriormente. Además, la investigación experimental reciente proporciona nuevos conocimientos sobre los procesos de desarrollo afectados por la hormona tiroidea (Lee & Kim, 2015). Con base en la investigación de los autores que se centra en la capacidad de los bifenilos policlorados para alterar la expresión de genes que responden a la hormona tiroidea en el cerebro en desarrollo (Power et al., 2001).

Cáncer

Es un crecimiento anormal de tejido producido por la proliferación continua de células cancerígenas y tiene la capacidad de invadir y destruir de otros tejidos. Pueden tener su origen en cualquier tipo de célula de cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única, sino una serie de enfermedades clasificadas según los tejido y célula de su origen (Celano & Airb, 2016).

Clasificación del cáncer

Los tipos de cáncer se clasifican tradicionalmente de cuatro formas (Carbone, 2020). Primero, se clasifica de acuerdo con el tipo de tejido pueden ser carcinoma, si se originan en células epiteliales de la piel, tracto gastrointestinal, órganos internos y otros sitios anatómicos. Pueden ser de dos tipos adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas. Sarcoma si proceden de tejido adiposo, músculos, vasos sanguíneos o hueso. Mieloma, si se originan en las células de la médula. Leucemia, si el cáncer empieza en el tejido que forma la sangre, como la médula ósea, o en las células del sistema inmunitario. Linfoma sí el cáncer procede del tejido linfoide (Idikio, 2011). Los tipos mezclados corresponden al cáncer en el que se presentan dos o más componentes del cáncer.

La segunda clasificación corresponde a cáncer de tipo específico, es decir por el sitio primario de origen, como cáncer de próstata, hígado cerebro etc. La tercera clasificación es el sistema establecido por la OMS. En esta, el grado se expresa numéricamente, generalmente desde un grado bajo de 1, que indica un alto nivel de diferenciación celular, hasta un grado alto de 3 que indica poca diferenciación o indiferenciado (Vishwakarma & McManus, 2020).

La última clasificación está establecida por la diseminación del cáncer por todo el cuerpo de acuerdo con el sistema de Metástasis de Nudos Tumorales. Esta clasificación califica el tamaño o extensión del tumor primario (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M)(O'Sullivan et al., 2018).

Los agentes que causan esta enfermedad son llamados carcinógenos, sin embargo existen varios los factores que pueden afectar la probabilidad de que se desarrolle un cáncer, por lo cual no se puede definir una causa única (Kroemer & Pouyssegur, 2008). Muchos agentes, incluidos la radiación, los productos químicos y los virus, inducen cáncer tanto en animales de experimentación como en seres humanos (Blackadar, 2016).

Cáncer de tiroides

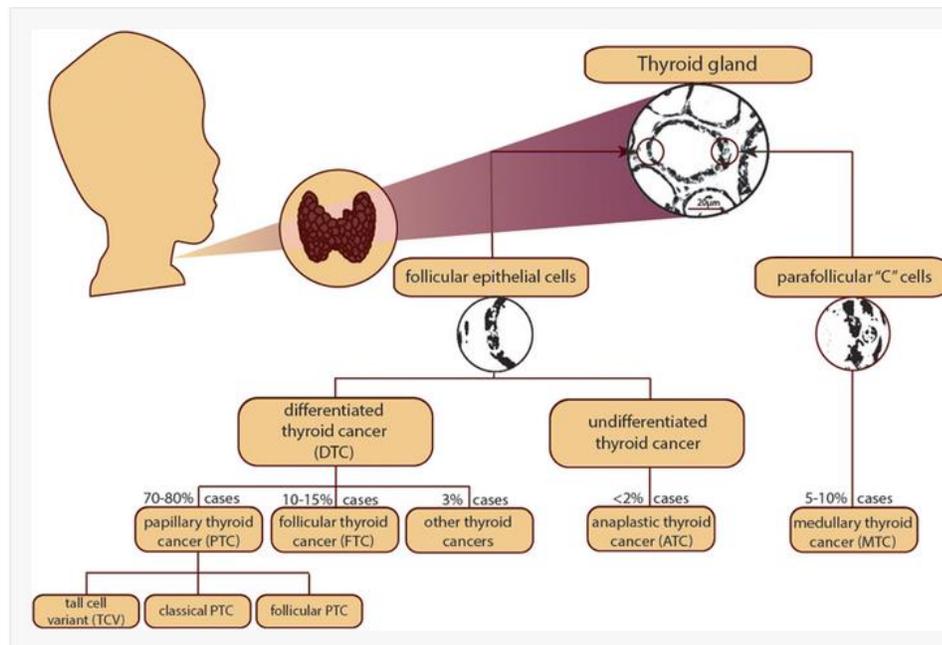
El cáncer de tiroides se origina en la glándula tiroides, esta glándula está ubicada en la parte frontal del cuello debajo de la laringe. La glándula tiroides absorbe yodo del torrente sanguíneo para producir las hormonas T3 y T4, una glándula tiroides sana es apenas palpable, si se desarrolla un tumor en la tiroides, se produce inflamación o agrandamiento de esta (Álvarez Montané, 2014). Existen 5 tipos de cáncer de tiroides (Figura 5):

- Cáncer papilar tiroideo: este se desarrolla a partir de las células foliculares y es de crecimiento lento, generalmente se encuentra en un lóbulo, de 10 al 20% se presenta en los dos lóbulos. Es el tipo más frecuente de cáncer de tiroides, es de tipo diferenciado y se puede diseminar a los ganglios linfáticos (Pusztaszeri & Bongiovanni, 2019).
- Cáncer folicular tiroideo: La neoplasia se desarrolla en las células foliculares, es un cáncer diferenciado, pero es menos frecuente que el papilar, este tipo de cáncer raramente se disemina a los ganglios.

- Cáncer de células de Hurthle: también llamado carcinoma de las células de Hurthle, surge de células foliculares, presenta mayor probabilidad de diseminarse a los ganglios linfáticos (Khatami & Tavangar, 2018).
- Cáncer medular de tiroides: el cáncer medular de tiroides se origina en las células C, puede resultar del síndrome genético llamado neoplasia endocrina múltiple tipo 2, el tumor tiene poca o ninguna similitud al tejido normal. Representa el 3% de todos los cánceres de tiroides (Hercbergs, 2019).
- Cáncer anaplásico de tiroides: es un cáncer raro y representa el 1% del cáncer de tiroides, es de crecimiento rápido y poco diferenciado. Este puede comenzar a partir de un cáncer de tiroides diferenciado o un tumor tiroideo benigno.

Figura 5.

Tipos de cáncer de tiroides y su origen



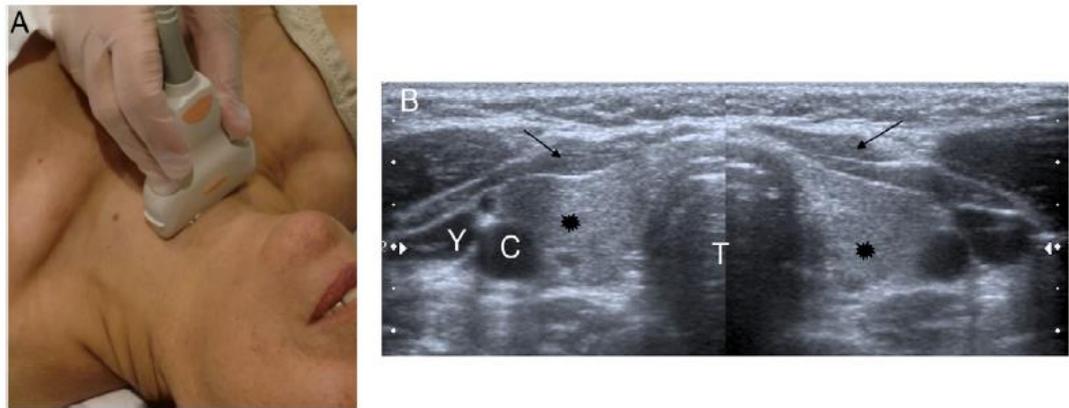
Nota: tomado de Pstr, Zienmnicka & Weso (2018)

Diagnóstico ecográfico del nódulo tiroideo

La ecografía tiene un papel importante en una evaluación inicial del nódulo tiroideo, varios signos ecográficos son altamente específicos (Figura 6), pero ninguno de ellos por sí solo permite determinar la malignidad de un nódulo tiroideo (Ramírez et al., 2009).

Figura 6.

A) Ecografía de tiroides extendida B) Tiroides normal, lóbulos tiroides (*), músculos infrahioideos (→), C carótida, T tráquea, Y yugular.



Nota: tomado de Chala *et al.*, (2013)

1. *Consistencia*: nódulos pueden ser sólidos, quísticos y mixtos. La característica más sensible y confiable es la consistencia sólida.
2. *Ecogenicidad*: los nódulos pueden ser hipoecogénicos, isoecogénicos o hiperecogénicos; del 92 -99% de los nódulos hipoecogénicos son malignos.
3. *Calcificaciones*: pueden ser microcalcificaciones, calcificaciones groseras o calcificaciones en cáscara de huevo (periféricas), las microcalcificaciones son una de las características que representa malignidad (Mitchell, Gandhi, Scott-Coombes, & Perros, 2016).

4. *Márgenes*: los nódulos tienden a tener márgenes bien establecidos, regulares o mal definidos o ser irregulares, incluso algunos pueden ser microlobulados. Los nódulos que presentan márgenes irregulares tienden a ser un 91.8% malignos y la mayoría de los nódulos con márgenes regulares son benignos (Manso, García & Velasco, Marcos, 2015).

5. *Halo*: es un anillo hipoecogénico debido a la pseudocápsula fibrosa, a un infiltrado inflamatorio o a parénquima comprimido, un halo uniforme y completo es sinónimo de nódulos benignos (Palit, 2019).

6. *Forma*: un nódulo ovalado con un diámetro asimétrico se asocia a malignidad con un 93% de probabilidad.

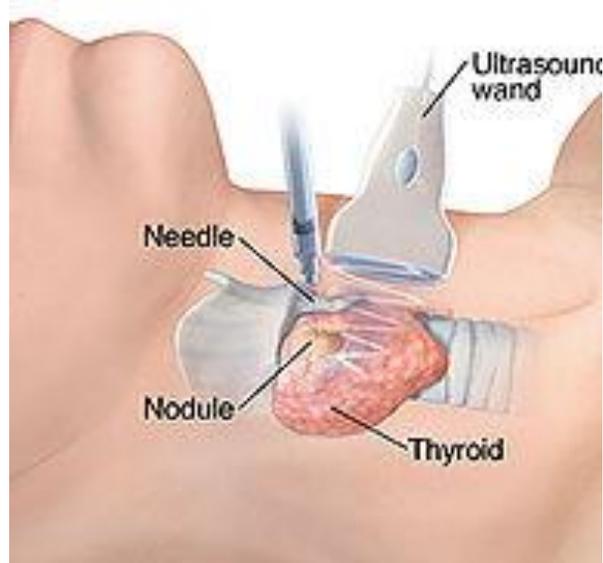
7. *Patrón de vascularización*: se clasifican en flujo ausente, vasos periféricos y vasos centrales, este patrón central de vascularización está en 74% de nódulos malignos, sin embargo, es un signo poco específico (Chala et al., 2013).

Biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF)

BAAF es la prueba más precisa para la evaluación de nódulos tiroideos, se realiza bajo guía de una ecografía. Una aguja muy fina es guiada dentro del nódulo tiroideo y una pequeña muestra de células es aspirada por la aguja (Lim, Devesa, Sosa, Check, & Kitahara, 2017). Los nódulos pueden ser sólidos o quísticos. Las lesiones quísticas poseen una probabilidad baja de ser malignos (3%), en los nódulos si su componente es sólido existe una probabilidad del 10% de ser malignos (Pan & Wang, 2018).

Figura 7.

Biopsia por aspiración de aguja fina de un nódulo de tiroides



Nota: Tomado de Pan & Wang, (2018)

La punción por aspiración con aguja fina del nódulo tiroideo es el método de referencia para su evaluación; este es un procedimiento seguro, rápido y de bajo costo. El BAAF puede tener los siguientes resultados:

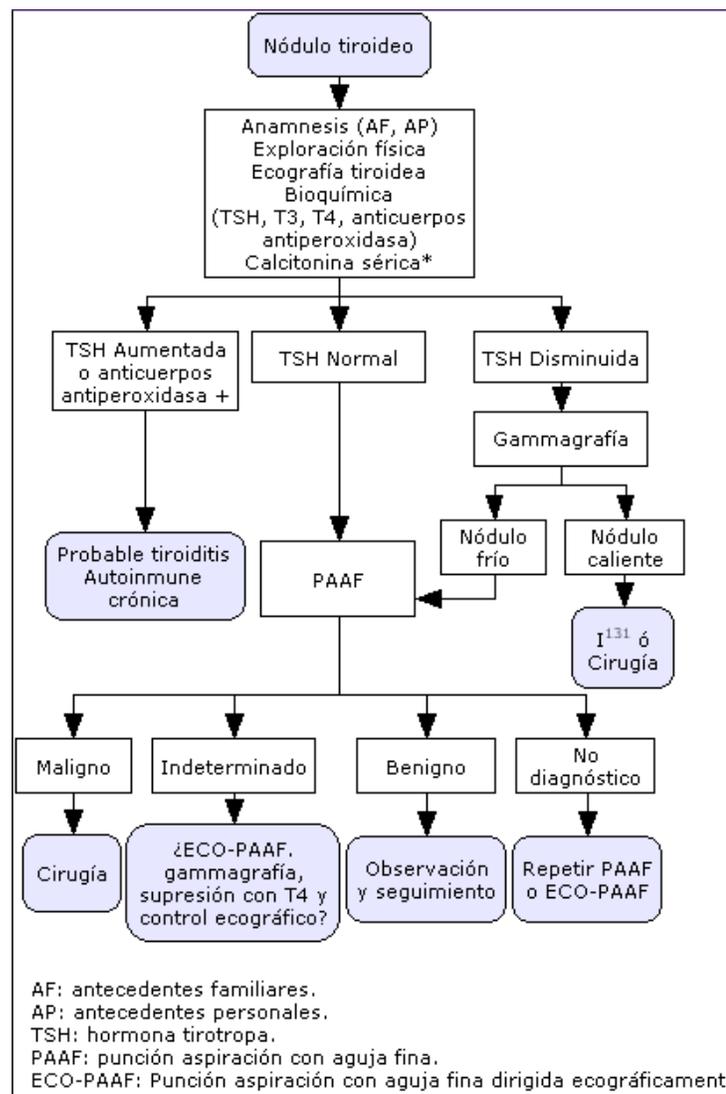
No diagnóstico. No existe suficientes células para dar un diagnóstico y es necesario repetir la biopsia. En algunos casos existe una alta sospecha de cáncer o es necesario una tiroidectomía parcial o total (Malheiros et al., 2018).

Benigno. Resultado patológico benigno, significa que no exista evidencia de cáncer, la precisión del BAAF es del 95 al 97%.

Maligno. Un diagnóstico de cáncer en la biopsia es exacto con un 98%, puede ser cáncer papilar de tiroides o cáncer medular de tiroides. La mayoría de los diagnósticos se tratan con un tiroidectomía total o parcial, es recomendable hacer una extracción de algunos ganglios linfáticos en el cuello (Manso, García & Velasco, Marcos, 2015).

Indeterminado. Existe un número de diferentes tipos de tumores que se consideran indeterminados: neoplasia folicular, neoplasma de células de Hurthle y lesiones atípicas (Lee & Kim, 2015). Una lesión indeterminada significa que las células no se observan normales, el 20% de diagnósticos de cáncer de tiroides son lesiones indeterminadas. En la figura 8 se presenta un diagrama para el diagnóstico de cáncer de tiroides.

Figura 8.
Algoritmo de diagnóstico de un nódulo tiroideo



Nota: tomado de Ugarta, (2004).

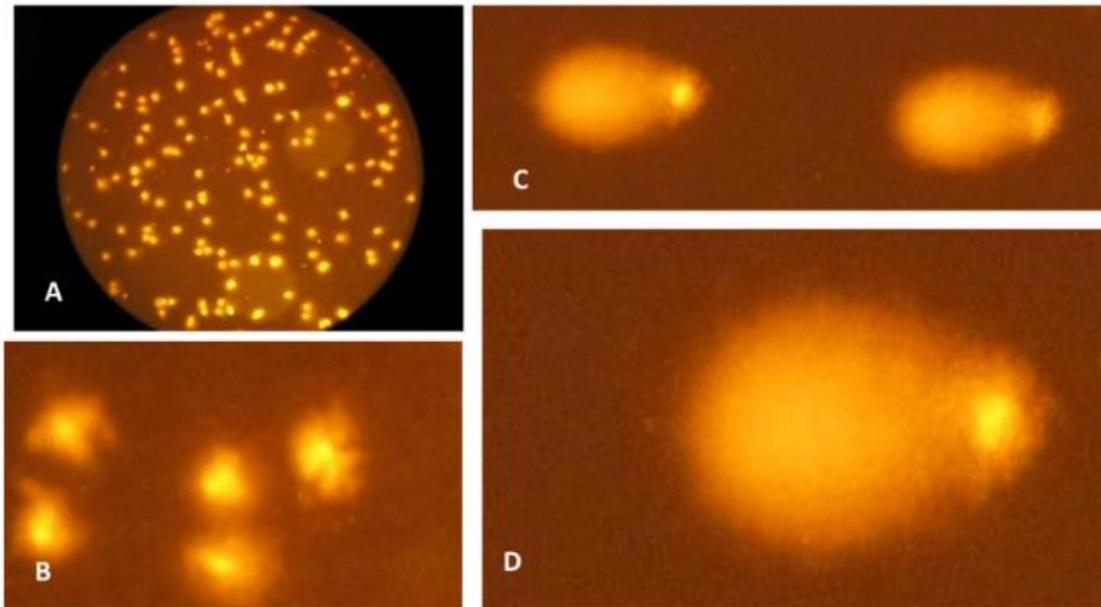
Ensayo Cometa

El bioensayo cometa, electroforesis alcalina de células individuales, es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos (Rodríguez-Rey, Noris-García, & Fundora Torres, 2016). El tipo de daño más simple detectado con este ensayo es la rotura de cadena doble, resultan en fragmentos de ADN que pueden ser detectados fácilmente, con una electroforesis a pH neutro, como lo realizaron Östling y Johanson (Figura 7).

En esta técnica las células son embebidas en agarosa y son añadidas en láminas de microscopía para ser sometidas a una electroforesis neutral, tras la lisis en sales y detergentes. Las células que presenten una elevada frecuencia de rupturas de doble cadena migran hacia el ánodo (Zúñiga Venegas, 2009).

Figura 9.

Células con daño en el ADN, detectado a través del ensayo cometa



Nota: tomado de Montes et al., (2011).

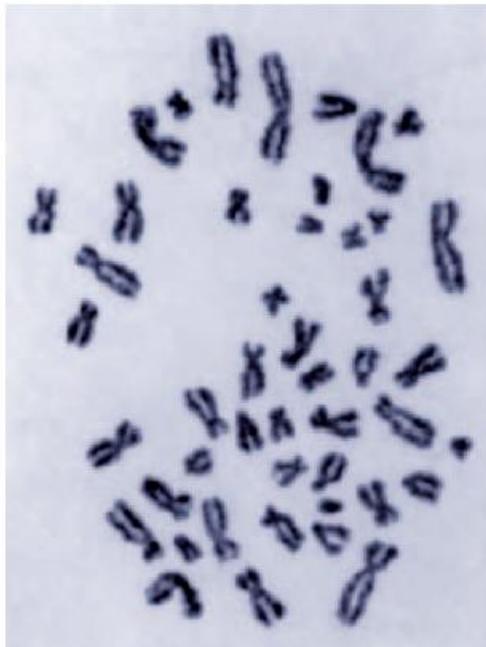
Citogenética

La citogenética es el estudio de los cromosomas, su estructura como y su número, como también las enfermedades relacionadas con estos. Estas pueden ser causadas por anomalías en su estructura o en su número (Larripa, 2011). Los primeros estudios se dieron en el siglo XIX, cuando Flemming en 1882 publicó las primeras imágenes del cromosoma humano a partir de observaciones al microscopio, Waldeyer años más tarde describió al cromosoma como un cuerpo coloreado (Tamar, Constanza, & Fonseca, 2008), estas descripciones llevaron a varias interrogantes.

En 1956 Tjio y Levan, establecieron que el hombre tiene 46 cromosomas en células somáticas normales, esto fue el punto de partida para investigaciones siguientes. En esa época se ordenaba los cromosomas por el tamaño y la posición del centrómero en 7 grupos: A, B, C, D, E, F, y G (Larripa, 2011).

Figura 10.

Fotografía original de Tjio y Levan donde establecen que el hombre tenía 46 cromosomas.

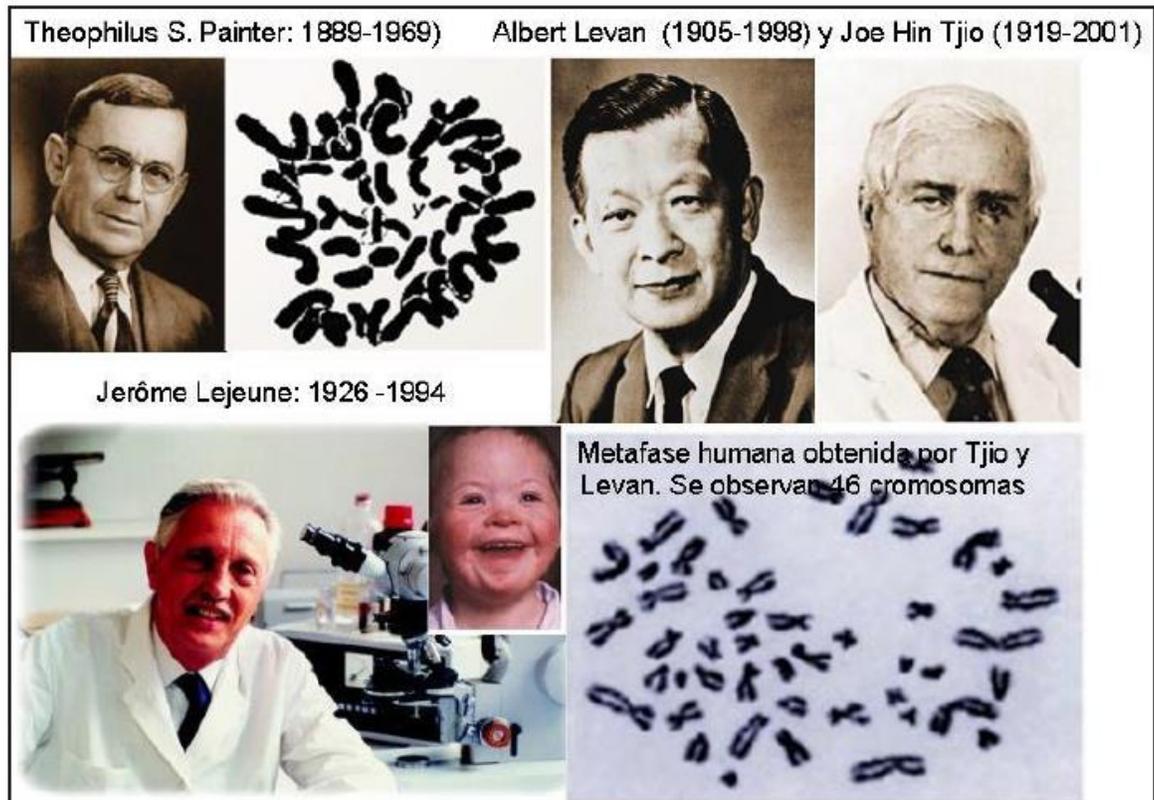


Nota: tomada de Caspersson, Zech & Johansson, (1970).

Theophilus Painter en 1921 describió un pequeño cromosoma en marsupiales y en 1923 lo observó en células humanas, denominó a este cromosoma como “Y” (Drets, 2016). La primera aberración cromosómica humana fue descrita en 1959, cuando Jerome Lejeune un médico interesado en la homogeneidad de los rasgos fenotípicos de niños con síndrome de Down determinó que el síndrome era una posible aberración cromosómica (Tamar et al., 2008).

Figura 11.

Los padres de la citogenética: Theophilus S. Painter y su cariotipo donde se muestra el cromosoma Y. Levan y Tjio, determinaron el número de cromosomas humanos, Lejeune determino la primera aberración cromosómica en el síndrome de Down.



Nota: tomado de Tamar et al., (2008).

Otras anomalías cromosómicas se identificaron en el mismo año, se identificaron los primeros casos de la ausencia del cromosoma X fue determinado en el síndrome de Turner (45, X) aneuploidías de los cromosomas sexuales y un cromosoma X adicional era el responsable de las alteraciones fenotípicas en el síndrome de Klinefelter (47, XXY) (Soriano-Torres & Arencibia, 2010) (Tamar et al., 2008).

En 1960 se identificó otros síndromes como el de Patau o trisomía 13 y el síndrome de Edwards o trisomía 18, Klaus Patau determinó estas anomalías congénitas en recién nacidos (Schubert, 2007). Morrhead en este año publicó su técnica de cultivo de leucocitos a partir de sangre periférica obteniendo células en división mitótica, en esta década ya se analizaba roturas cromosómicas, intercambio de cromátidas para determinar el daño inducido al ADN por agentes genotóxicos o exposición a diversos mutágenos (Larripa, 2011).

Sajiro Makino, Albert Levan y George Klein, publicaron su estudio en el cual demostraron que líneas celulares cancerígenas tendían a ser mitóticamente inestables y presentaban un número cromosómico variable (Drets, 2016). La primera alteración estructural descrita fue la presencia de un cromosoma de menor tamaño, parcialmente delecionado en la leucemia mieloide crónica; se denominó cromosoma Philadelphia (Ph1) por la ciudad donde se hizo el hallazgo (Villaverde, 2000). Años después se la describió con translocación 9:22 y se pensaba que era una deleción del cromosoma Y ya que los pacientes analizados eran hombres; sin embargo, estudios posteriores demostraron que estaba presente en mujeres con el mismo tipo de leucemia (Calasanz, 2001).

Fitohemaglutinina

La fitohemaglutinina es una lectina también denominada *PHA*, es una proteína parcialmente purificada que se encuentra en la mayoría de vegetales principalmente de leguminosas como la *Phaseolus vulgaris* L (Romo, Díaz, & Laguardia, 1968). La PHA aglutina eritrocitos y leucocitos; se une a oligosacáridos y estimula la mitosis en linfocitos, era usada para la separación de células sanguíneas (Ruiz, Boffill, González, & Blanco, 2005). La fitohemaglutinina es un inmunomodulador, permite que los linfocitos se conviertan en linfoblastos en 24 horas (L. González, Sáenz, Rodríguez, & Porras, 2002).

Tipos de bandeo cromosómico

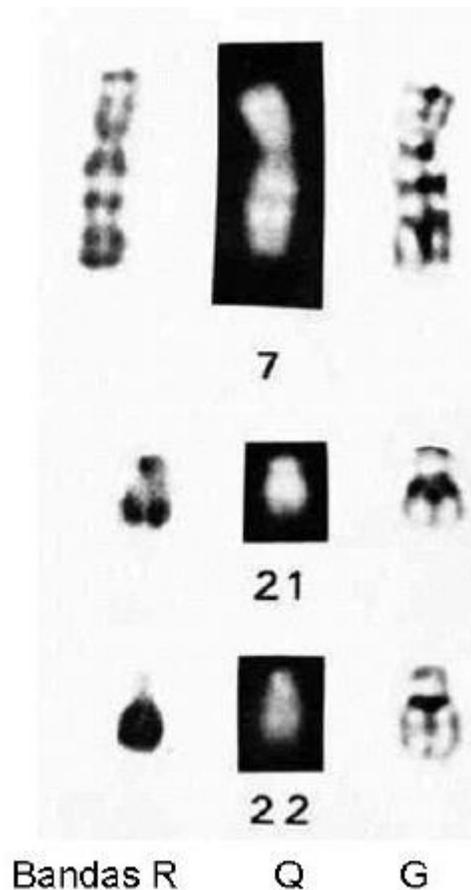
En los años 70, se introdujo las técnicas de bandeo cromosómico a los estudios de citogenética, aumento así la posibilidad de diagnosticar enfermedades genéticas (Lopez, 1986). Casperson y Col descubrieron los marcadores fluorescentes y su capacidad para teñir cromosomas metafásicos, en 1970 se publicó el patrón de bandeo con fluorescencia, bandas Q por quinacrina (Larripa, 2011); en los años siguientes se descartó este bando por el bandeo con Giemsa ya que tenían una mejor resolución y tinción, mejorando así el mapeo genético de varias enfermedades (Soriano-Torres & Arencibia, 2010).

Evans, Seabright y Lejeune en años siguientes descubrieron métodos que producían un patrón de bandeo similar (Bandas G) o patrón de reversa (Bandas R) (Calasanz, 2001), también se implementaron técnicas que permitían establecer bandas específicas para determinadas regiones cromosómicas como la heterocromatina (Bandas C) o regiones teloméricas (Bandas T) y en el nucléolo (Bandas NORs) (Villaverde, 2000).

Las técnicas de bandeo se puede lograr diferentes niveles de resolución dependiendo el estado de condensación cromosómica permitiendo así un análisis adecuado de cada uno de los cromosomas de forma individual (Rojas et al., 2012). Las bandas C y bandas R son las más usadas por sus características, las bandas se pueden dividir morfológicamente por la heterogeneidad de la cromatina: bandas G, bandas R, bandas Q, bandas C y bandas T (Gartler, 2006).

Las bandas G o bandas GTG se producen por la acción proteolítica de la enzima tripsina que tiñe regiones ricas en A-T, en las bandas R se tiñen zonas ricas en G-C y se producen por someter la placa a solución salina, temperaturas altas y tinción con Giemsa (Schubert, 2007).

Figura 12.
Cromosomas 7, 21 y 22 con tinción de bandas R, Q y G.



Nota: Tomado de Tamar et al., (2008).

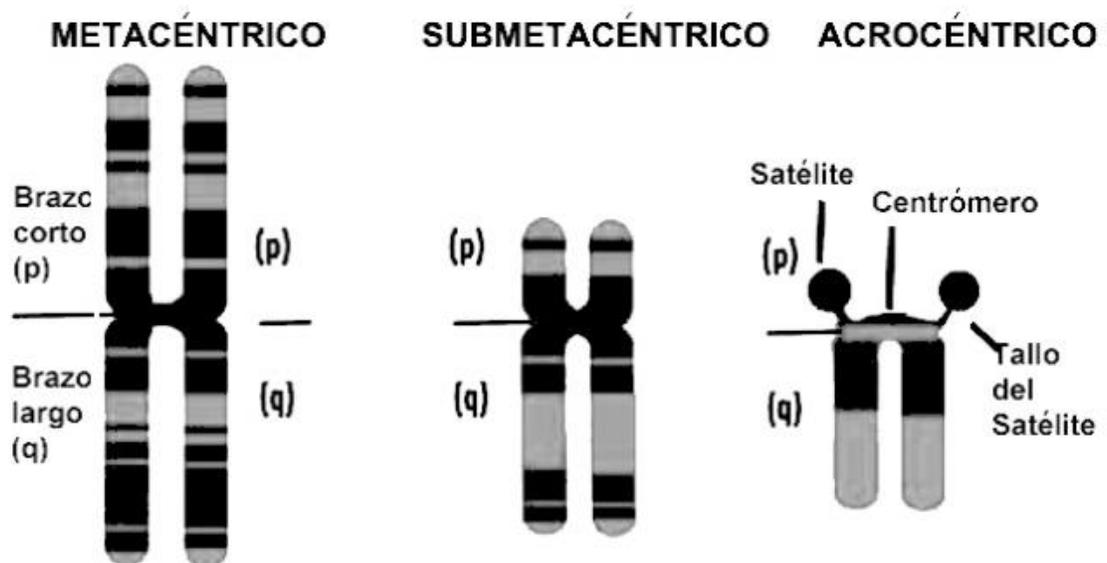
Cariotipo

Es la organización de cromosomas de acuerdo con el tamaño y posición del centrómero. Con el descubrimiento de varias técnicas de bandeo se logró identificar los cromosomas individualmente, Casperson et al., mediante fluorescencia obtuvo el patrón de las bandas Q y Seabright mediante digestión enzimática obtuvo el patrón de las bandas G, estos dos patrones se utilizaron para la clasificación de los cromosomas (Garcia-Sagredo, 2008).

Los cromosomas humanos tienen tres formas, longitud de brazos, *corto (p) o largo (q)*, y su posición del centrómero, los cromosomas metacéntricos presentan los brazos de la misma longitud, submetacéntricos tienen una distinción de brazos largo y cortos y los acrocéntricos presentan el centrómero muy cerca de uno de los extremos de los brazos (Gomez, 2020). Los cromosomas poseen un telómero que se encuentra en el extremo del brazo corto, está constituido por una secuencia repetida de TTAGGG.

Figura 13.

Clasificación morfológica de los cromosomas según la posición del centrómero según Levan et al. 1964.



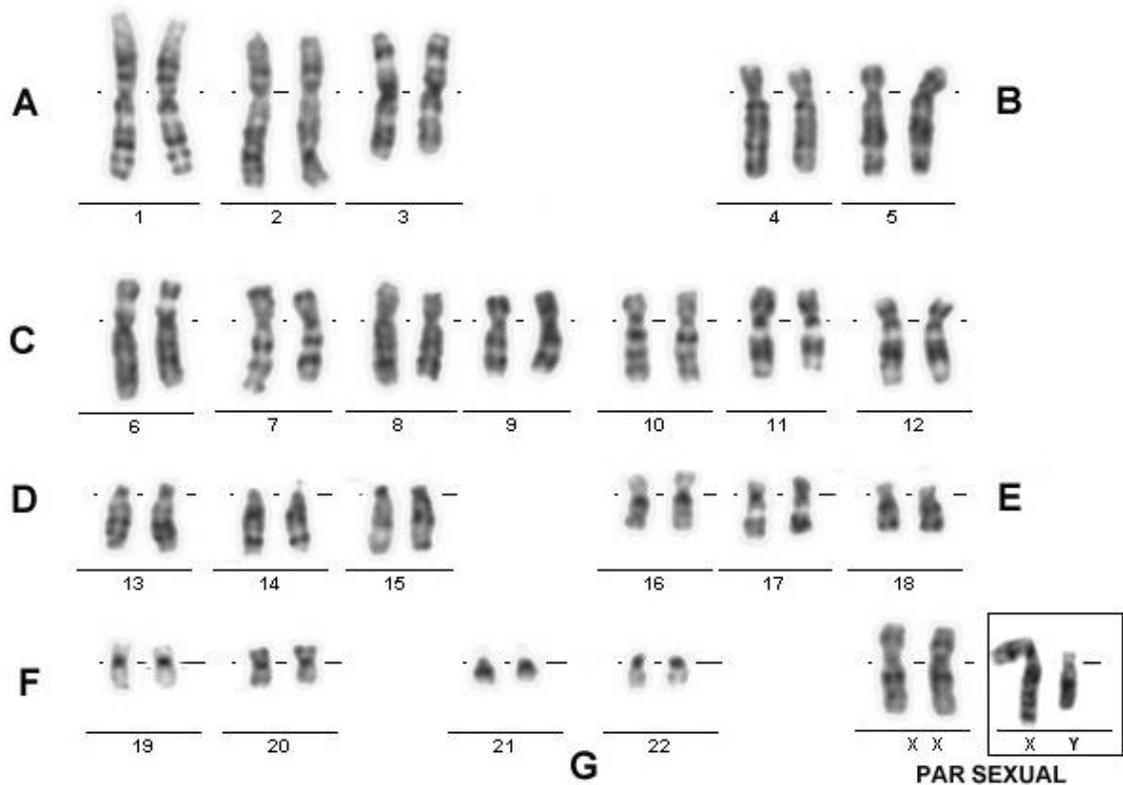
Nota: tomado de Gomez, (2020).

El ser humano posee 46 cromosomas, 22 pares de cromosomas homólogos o autosomas y un par de cromosomas sexuales, la división de estos cromosomas es la siguiente:

- Grupo A: Pares de cromosomas metacéntricos 1 y 3; pares de cromosoma submetacéntrico 2.
- Grupo B: Pares de cromosomas submetacéntricos 4 y 5
- Grupo C: Pares de cromosomas submetacéntricos 6,7,8,9,10,11, 12 y X.
- Grupo D: Pares de cromosomas acrocéntricos 13,14 y 15.
- Grupo E: Pares de cromosomas metacéntricos 16 y pares de cromosomas submetacéntricos 17 y 18.
- Grupo F: Pares de cromosomas metacéntricos pequeños 19 y 20.
- Grupo G: Pares de cromosomas acrocéntricos pequeños 21,22 y Y.

Figura 14.

Cariotipo normal clasificado en los 7 grupos y el par de cromosomas sexuales (Femenino)

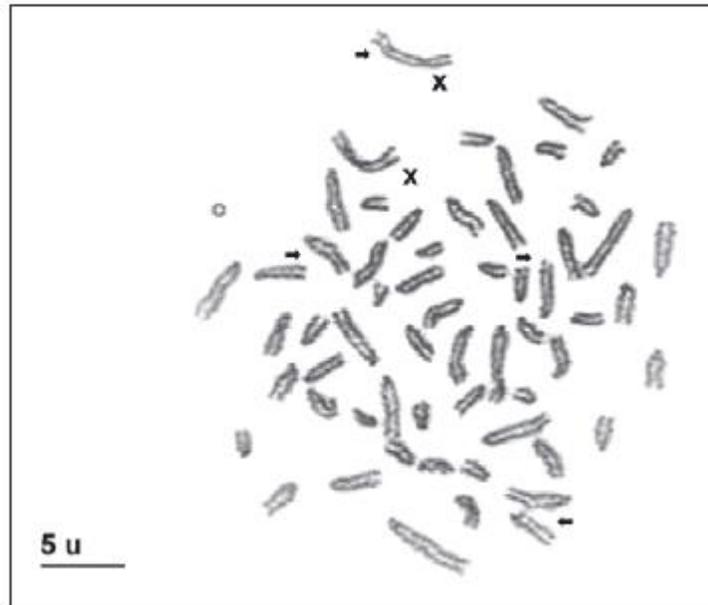


Nota: tomado de Bueno, (2011).

Los estudios citogenéticos de células neoplásicas han demostrado que existen cambios cromosómicos consistentes, los cuales no se producen de una manera fortuita y tienen un papel importante en la transformación neoplásica (Luo, Sun, Cormack, & Boeke, 2018). El cariotipaje permite conocer la constitución cromosómica de una célula, este es igual a la dotación cromosómica completa de una persona; es la representación gráfica de los cromosomas ordenados en pares homólogos (Jiang et al., 2017).

Figura 15.

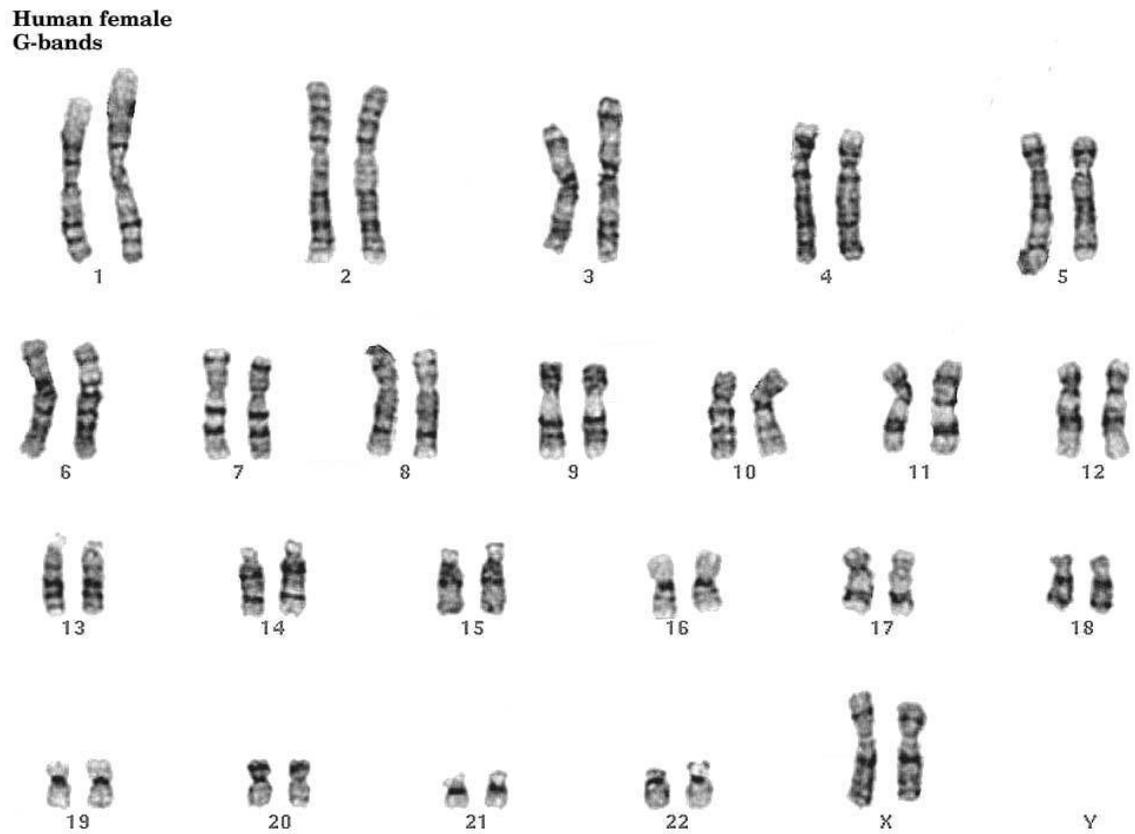
Metafase tratada con 5' azacitidina, las flechas indican sitios con fragilidad cromosómica.



Nota: tomado de Lambí, (2007).

Entre el 3 y 5% de los nacimientos en una población y periodo establecido, presentan alguna anomalía congénita que puede ser detectado en el nacimiento, este porcentaje aumenta conforme crecen los recién nacidos hasta en un 10%. La mayoría de embarazos con anomalías cromosómicas no concluyen o terminan en abortos (Descailleaux & Velasquez, 2000), la fragilidad cromosómica se puede definir como regiones del cromosoma metafásico con tendencia a alteraciones como fracturas, quiebres o discontinuidad (Llambí & Núñez, 2007). Los estudios de fragilidad cromosómica permiten establecer genes implicados en la activación de oncogenes o inactivación de genes supresores tumorales.

Figura 16.
Cariotipo femenino normal, paciente de 60 años.



Nota: tomado de Stevens et al., (2017).

Es una prueba genética que se usa en busca de enfermedades provocadas por irregularidades en los cromosomas, existen 44 cromosomas autosomas agrupados en 22 pares y 2 cromosomas sexuales (Stölzel et al., 2016). Para realizar la prueba es necesario una muestra de tejido celular como: líquido amniótico, sangre, médula ósea o placenta.

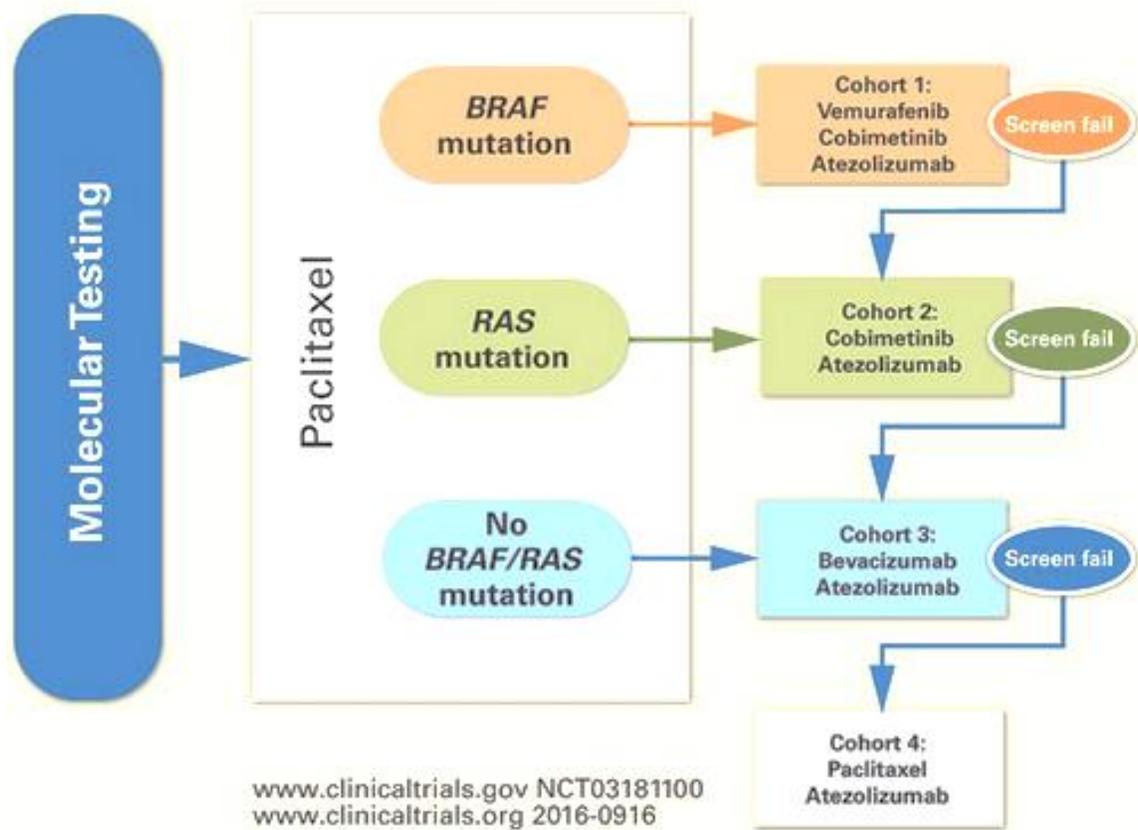
Etiología del cáncer de tiroides

En la etiología del cáncer de tiroides intervienen varios factores genéticos como alteraciones de las vías metabólicas intracelulares, estas alteraciones se deben a mutaciones puntuales en genes que regulan estas vías, alteración de su expresión, cambios epigenéticos como metilación de genes y factores ambientales (Marrero, Sinconegui, & Cruz, 2013).

La principal alteración es la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), es una vía que depende de la activación de un receptor de membrana con actividad tirosina quinasa (RET); que a su vez regula la activación de una cadena de fosforilaciones sucesivas de varias proteínas citoplasmáticas (Chiganer et al., 2011), El oncogén RET codifica un receptor transmembrana de las tirosinaquinasa que está involucrado en crecimiento, diferenciación y migración de los tejidos en desarrollo.

Los marcadores moleculares de la glándula tiroides corresponden a mutaciones genéticas que inician en las células tiroideas malignas, estas alteraciones genéticas son más comunes en la neoplasia papilar de tiroides, son las mutaciones de los genes de la familia de quinasas tipo serina/treonina (BRAF), mutaciones en la proteína G monomérica, una GTPasa con actividad reguladora GTP hidrolasa (RAS), mutaciones del gen que codifica un factor de transcripción nuclear (P53) y reordenamientos del gen RET con el gen CPT, REP/CPT (Marrero et al., 2013).

Figura 17.
 Marcadores moleculares del cáncer de tiroides



Nota: tomado de Puztaszeri & Bongiovanni, (2019)

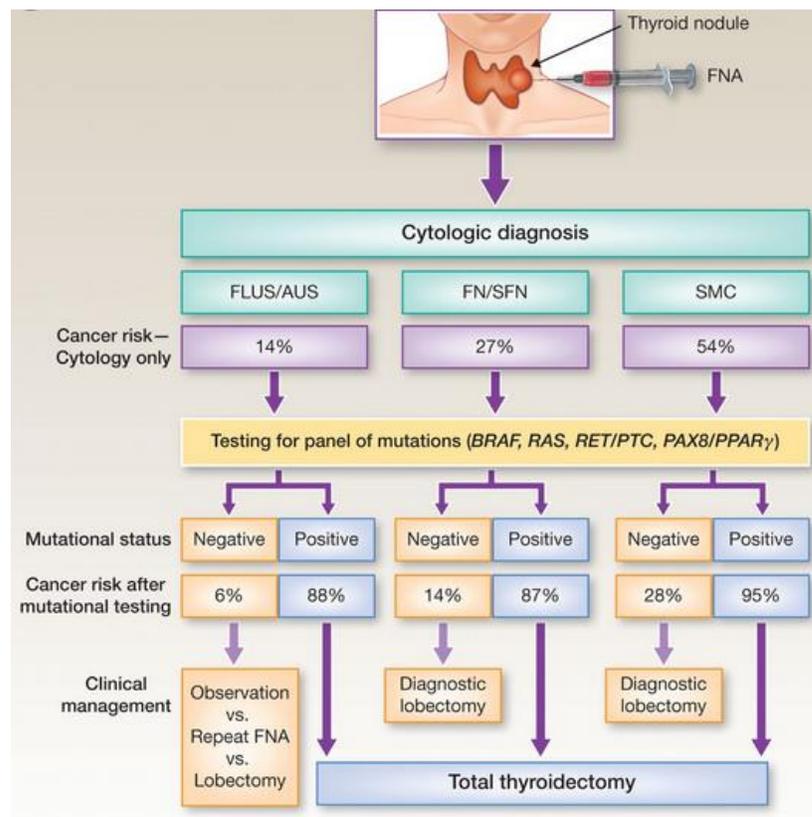
Genética del cáncer de tiroides

Next Generation Sequencing permite la detección de todos los tipos de variantes del ADN humano (pequeñas sustituciones, deleciones o inserciones, inversiones o translocaciones), permite la búsqueda de mutaciones nuevas o causantes de alteraciones en el genoma completo. El ADN se fragmenta y mediante ligación se les añade secuencias adaptadoras a los extremos, los fragmentos de ADN al ser amplificados clonalmente, se agrupan para ser utilizados como molde para secuenciar, la secuenciación se realiza alternando ciclos de terminación reversible cíclica (CRT) (Cha & Koo, 2016).

La reacción CRT utiliza terminadores reversibles para incorporar nucleótidos marcados fluorescentemente, las secuencias cortas producidas a partir de los extremos de ADN son los adaptadores se denominan lecturas o reads (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012). Las nuevas secuencias generan lecturas a partir de cada uno de los extremos de un fragmento de ADN (inserto).

Un aspecto importante en la secuenciación de nueva generación es el número de copias de cada base del genoma presente en los reads de secuenciación producidos. La detección de variantes genéticas a partir de datos de NGS consiste en identificar diferencias en la secuenciación de ADN de un individuo al compararlo con un ADN de referencia (Scheijen et al., 2019).

Figura 18.
Variantes genéticas del cáncer de tiroides y sus porcentajes



Nota: tomado de Mitchell et al., (2016).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Localización Geográfica

El presente estudio fue realizado en conjunto el Centro de Investigación Genética y Genómica-CIGG con la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, con el fin de realizar la estandarización de protocolos para la caracterización de células de cáncer de tiroides.

El trabajo estuvo dirigido metodológicamente en tres fases: primero la estandarización del protocolo para determinar el cariotipo de células cancerígenas, seguido del diseño de un protocolo para la determinación de la genotoxicidad de células de cáncer y una revisión bibliográfica para determinar variantes genéticas del cáncer de tiroides.

Preparación de medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo RPMI suplementado, se limpió la cámara de flujo laminar con alcohol y luz UV. Se utilizó 100 mL de RPMI 1640, 12.0 mL de suero fetal bovino, 1.0 mL de L-Glutamina, 1.0 mL de antibiótico-antimicótico, 1.5 mL de Hepes Buffer y 5 mL de fitohemaglutinina.

Cultivo de muestra

Las muestras de sangre fueron tomadas en tubos vacutainer heparinizados (tapa verde), se limpió y desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol y luz UV por 10 minutos. Se descongeló las alícuotas de medio en baño maría a 37 °C.

Se rotuló con el número de muestra y fecha. Se colocó los tubos y las muestras en la cámara de flujo laminar, así como todo lo necesario para el cultivo de linfocitos. Se colocó aproximadamente 600 µl en el medio directamente de la muestra que fue previamente agitada. Se incubó la muestra a 37 °C por 72 horas, se limpió la cámara de flujo laminar. La muestra sobrante se guardó para estudios posteriores.

Cosecha de cultivo de sangre periférica

Cosecha de cultivo

Se añadió 200 μ l de Colcemid® a cada cultivo y se incubó a 37 °C en baño maría durante 25, 40 y 60 minutos y se preparó las siguientes soluciones:

Choque Hipotónico

Se disolvió 1.35 gramos de KCl en 250 mL de agua destilada, la solución se conservó a 4 °C. Se calentó los mL necesarios dependiendo del número de muestras. En la tabla 1, se presenta la cantidad de choque hipotónico por el número de muestras a usarse.

Tabla 1.
Preparación de Choque Hipótonoco (KCl 0.54%)

MUESTRA	SOLUCIÓN DE CHOQUE HIPOTÓNICO (mL)
1	6
2	12
3	18
4	24
5	30
6	36
7	42
8	48
9	54
10	69

Fijador de Carnoy

Se preparo el fijador en proporciones 3:1 y se la llevó por 30 minutos a – 20 °C. Se disolvió 3 porciones de metanol por una porción de ácido acético. La tabla 2 se presenta las cantidades usadas.

Tabla 2.
Preparación de Fijador de Carnoy (3:1)

Muestra	Metanol (ml)	Ác. Acético (ml)	Total, Fijador Carnoy (3:1)
1	18	6	24
2	36	12	48
3	54	18	72
4	72	24	96
5	90	30	120
6	108	36	144
7	126	42	168
8	144	48	192
9	162	54	216
10	180	60	240

Una vez preparadas las soluciones necesarias, se calentó la cantidad de choque hipotónico necesario en baño maría a 37 °C (se comprobó con un termómetro la temperatura). Una vez transcurrido el tiempo con colcemid, se centrifugó la muestra por 10 minutos a 2500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se absorbió la muestra en la pipeta y se la mantuvo hasta colocar 6 ml de choque hipotónico a 37 °C por 5 minutos.

Se colocó el contenido de la pipeta lentamente por las paredes del tubo, se resuspendió hasta que la mezcla quedó homogénea y se incubó en baño maría por 25 minutos a 37 °C. Se centrifugó por 10 minutos a 2500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió de 2 a 3 veces con 6 mL de fijador Carnoy y se llevó la muestra a -20 °C por 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, se centrifugo por 10 minutos a 2500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió. Se absorbió la muestra con la pipeta y se mantuvo hasta colocar 6 ml de fijador, se colocó la muestra rápidamente y se resuspendió de 2 a 3 veces. Se centrifugo la muestra por 10 minutos a 2500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado hasta lograr un precipitado celular limpio y hasta que el sobrenadante (fijador) estuvo transparente. Se llevó a 4 °C por 24 horas antes de extender la placa.

Una vez que se obtuvo el precipitado celular blanco y líquido fijador transparente y se dejó reposar por 24 horas para realizar la extensión y tinción. Se preparó el portaobjeto con un 50% de humedad, se resuspendió el precipitado con fijador de Carnoy (aproximadamente 900 μ l). Se tomó la muestra con una micropipeta (100 – 200 μ l) y se dejó caer a una distancia lo más alta posible sobre el portaobjetos para abarcar toda el área. Se realizó 3 portaobjetos por muestra: 1 para ver estructura y número cromosómico y 2 para bandedo GTG.

Se dejó secar los portaobjetos a temperatura ambiente por 25 minutos, una vez seca las muestras se tiñó con Giemsa por 3 minutos.

Bandedo GTG de cromosomas

Se preparó las siguientes soluciones una hora antes del ensayo: Tripsina (1:250): Se diluyó 1 mg de tripsina (GIBCO) en 25 mL de H₂O y se realizó alícuotas de 4 mL y se llevó a – 20 °C hasta su uso. NaCl (0.92 %) solución salina. Se diluyó 1,38 g de NaCl en 100 ml de H₂O destilada. Se preparó en 3 frascos Coplin las siguientes soluciones:

Tabla 3.

Soluciones usadas para Bandedo GTG de cromosomas.

Solución		
A	Tripsina (1:250)	46 mL de solución salina 4 mL de solución tripsina
B	NaCl (Lavado 1)	50 mL de solución salina
C	NaCl (Lavado 2)	50 mL de solución salina

Antes de realizar el bandeo se secó los portaobjetos durante toda la noche a 56 °C en la estufa. En el frasco Coplin con la solución A, se sumergió las placas y se tomó el tiempo de bandeo, aproximadamente 45'' (el tiempo vario de acuerdo con la calidad y observación de bandas en el microscopio después de realizar la tinción).

Se sumergió las placas en la solución B para un primer enjuague y se agitó suavemente. Seguido se sumergió en la solución C para un segundo enjuague. Las placas se secaron en posición vertical a temperatura ambiente por 15 minutos. Se tiñó con Giemsa por 1 min 30''. En el caso de que no existieran bandas se destiño la placa con metanol y se repitió el proceso desde el secado de los portaobjetos. Los frascos Coplin permanecieron a 37 °C en el procedimiento de bandeo.

Se preparó 4 ml de solución Giemsa en 46 ml de H₂O destilada en un frasco coplin, se sumergió las placas por el tiempo deseado de acuerdo con la intensidad de coloración que se deseaba alrededor de 3 minutos. Se retiró las placas y se enjuago con agua corriente, se dejó secar las placas al ambiente. Se colocó 500 µL de etanol absoluto para fijar la placa y se colocó en el microscopio.

Se utilizó un microscopio óptico de contra fase, la observación de las placas se hizo de forma ordenada y metodológica para evitar contabilizar las mismas células. Se uso el Software GenASIs Bandview, primero se enfocó las células con el lente 10x, se colocó una gota de aceite de inmersión en el área de interés y se enfocó con el lente 100x.

Una vez enfocadas las células en metafase con los lentes de 100x se inició el modo LIVE en el software, después de enfocar y capturar la imagen se utilizó la función B (band view) para recortar y organizar los cromosomas para obtener su cariotipo. Se registro las metafases observadas, se tomó las coordenadas y algún dato cromosómico relevante.

Ensayo cometa

Las soluciones se prepararon de acuerdo con el anexo 1.

Preparación de placas

Se colocó los portaobjetos y cubreobjetos en etanol al 70% un día antes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, transcurrido el tiempo necesario se secó las placas con aire caliente. Se calentó la agarosa NMP en el microondas por 2 minutos y se colocó la solución en un frasco Coplin. Se sumergió las placas previamente etiquetadas en la agarosa por 1 minuto verificando que la placa este totalmente cubierta de un lado. Se limpió el exceso de agarosa y se dejó secar al ambiente por toda la noche. Se realizó una segunda capa de agarosa después de las 24 horas y se dejó secar al ambiente por 25 minutos.

Preparación de la muestra

Para inducir daño celular en muestras de sangre periférica se añadió 5, 10 y 20 μL de H_2O_2 , se tomó 5, 10 y 20 μL de muestra (sangre + H_2O_2) y se mezcló con 80 y 160 μL de LMP agarosa en tubos eppendorf de 200 μL y se resuspendió la mezcla hasta que se encuentre homogénea. En la tabla 4 se muestran las preparaciones usadas de sangre y H_2O_2 y en la tabla 5 las combinaciones de sangre y LMP 0.5% antes de colocar en las placas con NMP 0.6%.

Tabla 4.*Preparación de muestras con H₂O₂ al 10%.*

Muestra	Sangre (μL)	H ₂ O ₂ 10% (μL)
1	5	20
2	5	20
3	20	10
4	20	10
5	5	5
6	5	5
7	10	5
8	10	20
9	10	----
10	10	----

Tabla 5.*Preparación de muestras con H₂O₂ y LMP.*

Muestras	Sangre + H ₂ O ₂ (μL)	LMP (μL)
1	5	80
2	10	80
3	5	80
4	10	80
5	5	80
6	5	160
7	10	160
8	5	80
9	10	160
10	5	160

Se colocó la mezcla (sangre + LMP, aproximadamente 80 μL) en la placa con NMP agarosa, se colocó el cubreobjetos y se llevó a 4 °C por 12 minutos para su solidificación. Se preparó el tampón de lisis agregando 6 mL de DMSO y 5 mL de Triton en un frasco Coplin.

Se sacó la placa, se dejó reposar al ambiente por 2 minutos y se retiró lentamente el cubreobjetos deslizándolo hacia un lado. Se colocó 85 μ L de LMP agarosa, se cubrió nuevamente con un cubreobjetos y se llevó a 4 °C por 12 minutos. A partir de este momento, todo se realizó bajo luz roja.

Fase de lisis de membranas celulares

Se sacó las placas, se retiró el cubreobjetos cuidadosamente y se sumergió las placas en la solución de lisis por 1 hora a 4 °C y en la oscuridad. Transcurrido el tiempo necesario se sacó las placas de la solución de lisis y se lavó las placas con la solución de electroforesis.

Fase de desnaturalización

Se utilizó una cámara de electroforesis, se colocó las placas en la cámara, en contacto unas con otras evitando espacios, se llenó la cámara con la solución de electroforesis (600 mL) y se llevó a 0,5 cm por encima de las placas. Se llevó a 4 °C y se dejó por 20 minutos a oscuridad.

Fase de electroforesis

Se conectó los electrodos y la fuente de poder. Las condiciones de electroforesis fueron: 4°C, 25 V y amperaje a 300 mA por 30 minutos.

Fase de neutralización

Se sacó las placas de la cámara de electroforesis y se las colocó en una bandeja para realizar 3 lavados por 5 minutos cada uno con la solución de neutralización. Se retiró el exceso de líquido y se colocó de forma vertical para un mejor secado.

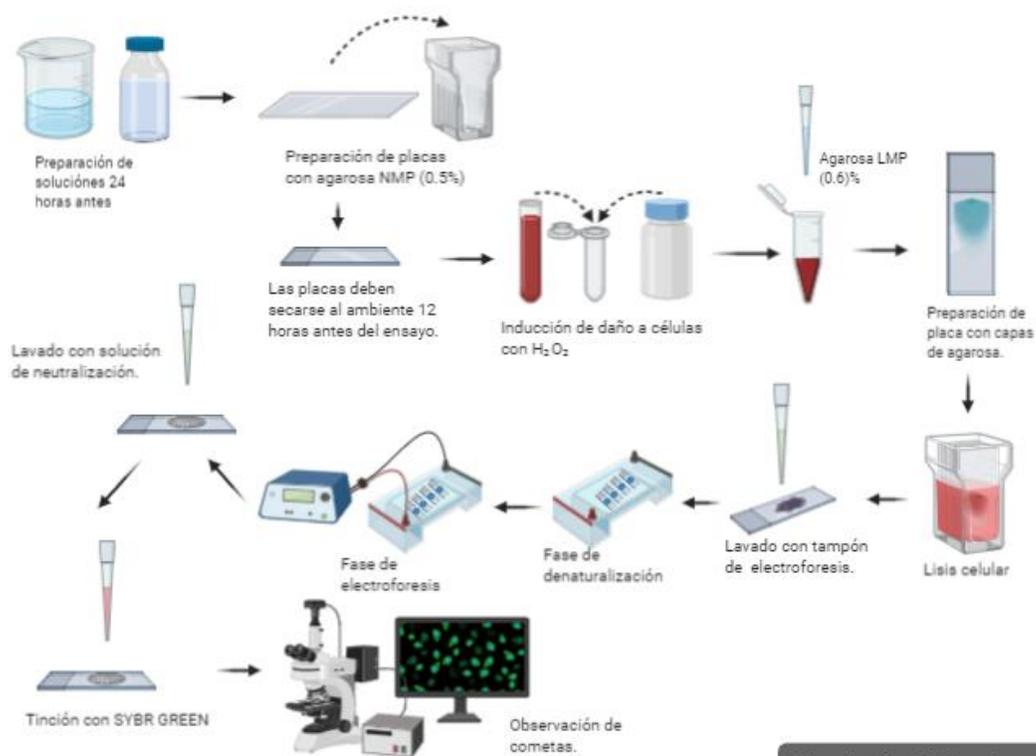
Fase de tinción

Se agregó 50 μ L de Sybr Green a cada placa.

Fase de análisis y observación

Se analizó 20 células por muestra, la observación se realizó en el microscopio de fluorescencia BX3 Olympus, longitud de onda (495nm), con filtro DAPI y COMET, utilizando el objetivo 40X y se observó si existía la presencia de cometas en las placas.

Figura 19.
Esquema ensayo cometa



Created in BioRender.com

Nota: Creado por Andrea Morillo en BioRender.

Fase de deshidratación y fijación de placas

Se colocó las placas de forma horizontal y se añadió 2 mL de etanol absoluto a cada placa por 5 minutos. Se retiró el exceso de etanol y se colocó las placas de forma vertical para que se evapore totalmente el etanol. Se guardó las placas en un lugar oscuro a temperatura ambiente por máximo 8 días antes de su análisis.

Búsqueda bibliográfica de variantes genéticas en cáncer de tiroides.

La revisión bibliográfica se realizó en bases de datos científicos como PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com>), SciELO (<http://scielo.isciii.es/scielo.php?lng=es>), Google Scholar (<https://scholar.google.com/?oi=gsb00&lookup=0&hl=es>), Science Research (<https://www.scienceresearch.com/scienceresearch/desktop/en/search.html>), entre otras. La información obtenida fue referente a tiroides, cáncer de tiroides, variantes genéticas, genes, frecuencia poblacional, cáncer papilar de tiroides, incidencia del cáncer de tiroides, entre otros.

Capítulo III: Resultados

Cariotipo

La obtención de metafases de alta calidad es esencial para obtener cromosomas definidos y claros. En un ensayo existo es necesario obtener una buena distribución de los cromosomas para poder distinguirlos entre sí. Un tiempo de incubación insuficiente producirá menos extensiones de metafases con cromosomas superpuestos y largos. Se realizó variaciones en el tiempo con colcemid, en la tabla 6 se establece las diferencias obtenidas.

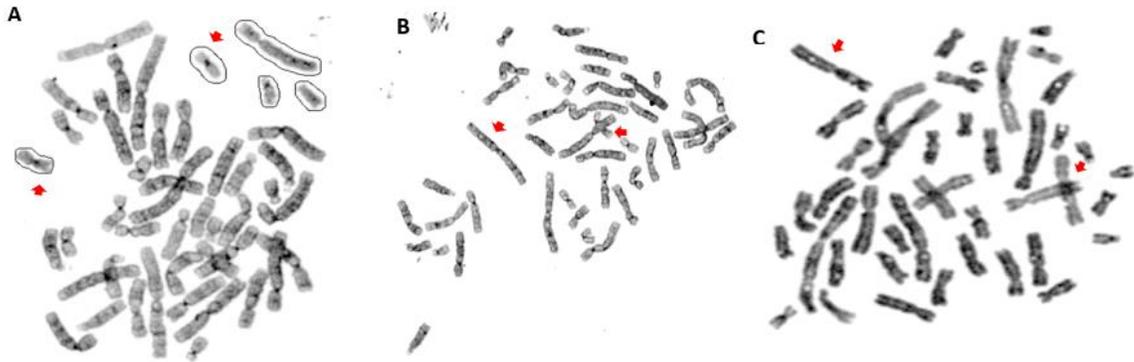
Tabla 6.
Variaciones en el tiempo de Colcemid

Muestras	Tiempo Colcemid	Observaciones
1	25 min	Pocas metafases
2	25 min	Cromosomas superpuestos
3	25 min	Cromosomas largos y no definidos
1	40 min	Metafases claras
2	40 min	Cromosomas largos
3	40 min	Metafases claras y cromosomas superpuestos
1	1 h	Cromosomas superpuestos
2	1 h	Cromosomas cortos
3	1 h	Cromosomas gruesos

Se usó un tiempo de 40 minutos con solución de Colcemid, ya que con esta se observaron metafases de buena calidad y dispersión con cromosomas claros y largos como se observa en la figura 20A, se observan cromosomas largos y no definidos, no se logra diferenciar cada cromosoma y se encuentran superpuestos, el tiempo con Colcemid fue de 25 minutos en las figuras 20B y 20C.

Figura 20.

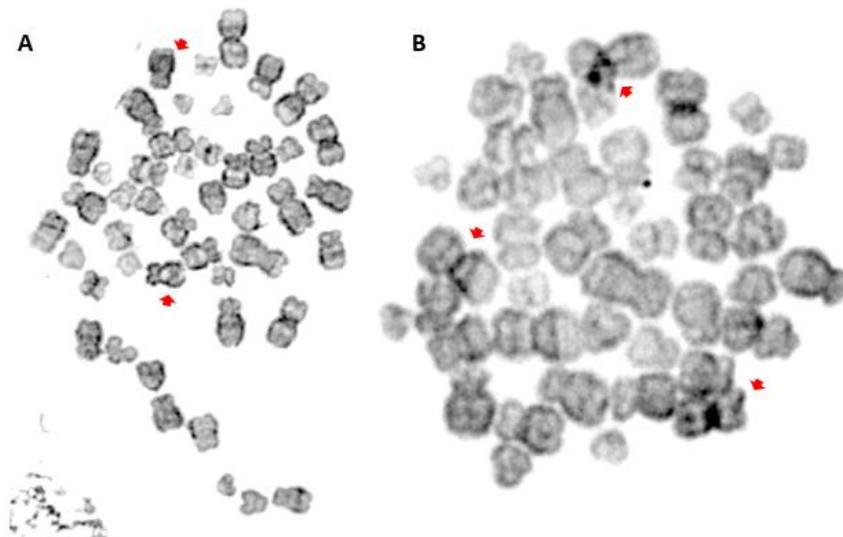
A) Se observa una metafase con buena dispersión, cromosomas con una buena morfología, largos y definidos (tiempo de colcemid, 40 min); B) Metafase con cromosomas largos y no definidos (tiempo de colcemid, 25 min); C) Metafase con cromosomas superpuestos (tiempo de colcemid, 25 min).



El colcemid detiene las células en metafase, una exposición prolongada a colcemid produce más células en metafase, pero se obtiene cromosomas más cortos y gruesos que son difíciles de analizar. Con 1 hora en solución de Colcemid, se obtuvieron metafases superpuestas con cromosomas cortos y más gruesos como se observan en la figura 21.

Figura 21.

A) Metafase con cromosomas cortos y presencia de ruido (tiempo de colcemid, 1 h); B) Metafase con cromosomas gruesos, superpuestos y no definidos (tiempo de colcemid, 1 h).



Se estableció un tiempo de incubación con Colcemid de 40 minutos ya que se obtuvo metafases claras, con cromosomas largos y diferenciados.

Se usaron 6 muestras, por cada muestra se realizó 2 placas y se analizaron 304 metafases. En la tabla 7, se observa las variaciones en tiempo en la solución de tripsina y en la tinción giemsa. El tiempo de exposición a tripsina es un factor importante para obtener bandas claras y con un buen contraste.

Tabla 7.
Tiempos en solución tripsina (1:250) y en tinción Giemsa

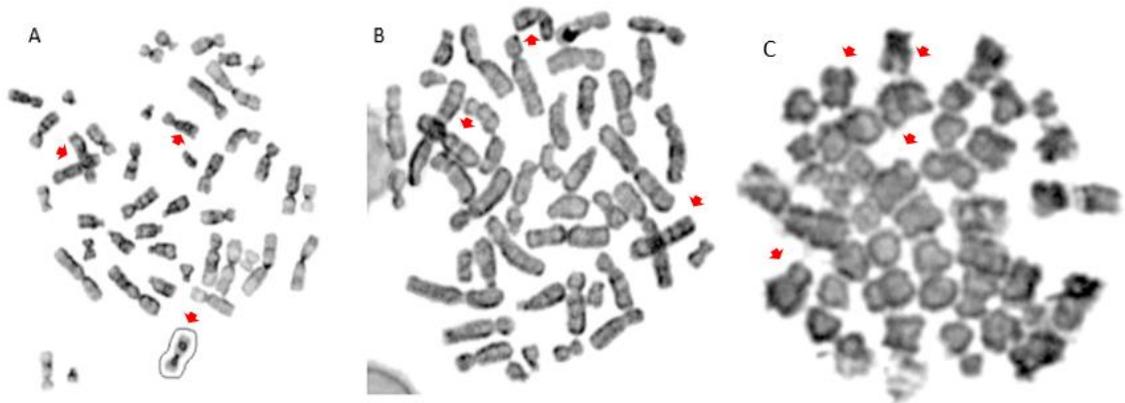
Muestra	Tiempo Solución Tripsina	Tiempo Tinción Giemsa	Observaciones
1	43 s	3 min	Bandas claras
1	41 s	3 min	No se observan bandas
2	42 s	2.40 min	Bandas quemadas y bandas claras
2	45 s	3 min	Bandas quemadas
3	41 s	3 min	Bandas gruesas
3	43 s	2 min	Bandas claras
4	42 s	2 min	Pocas bandas
4	43 s	2.30 min	Bandas claras
5	42 s	3 min	Bandas claras
5	41s	2.30 min	No se observan bandas
6	43 s	3.10 min	Bandas quemadas
6	43 s	2 min	Bandas claras y quemadas

Nota: en realizó nuevas placas hasta obtener bandas claras y presencia de metafases.

En las Figuras 22 se observan metafases con bandas gruesas y quemadas debido al tiempo en la solución de tripsina 0.5%.

Figura 22.

A) Cromosomas con bandas no definidas y gruesas; B) Metafase con superpuestos con bandas con bajo contraste; C) Metafase con cromosomas quemados.

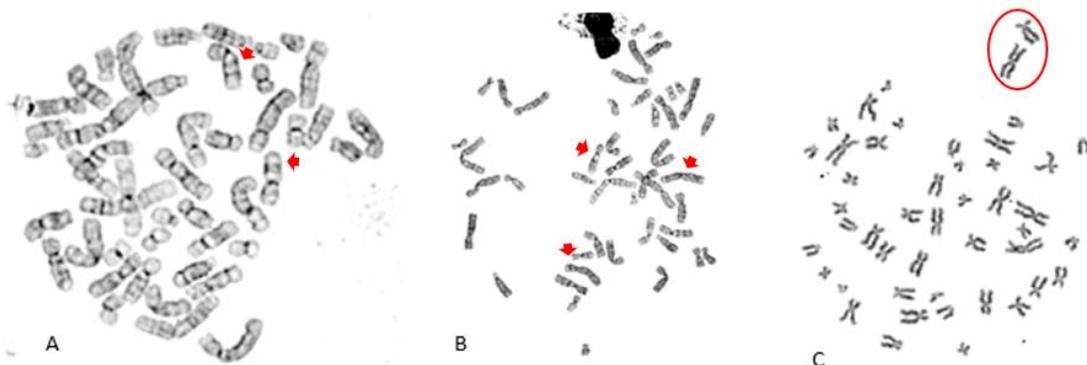


Nota: tiempo de exposición a la solución de tripsina fue de 45 s.

Los cromosomas con bandas GTG adecuadas contienen patrones característicos de bandas claras y oscuras. Con un tiempo de 43 s en la solución de tripsina se obtuvieron las siguientes metafases:

Figura 23.

Metafases con 43 s en solución tripsina, A) 2.40 min en tinción Giemsa, B) 2.30 min en tinción Giemsa y C) 2 min en tinción Giemsa.



En la figura 23A, se observan bandas claras y definidas en cromosomas cortos y gruesos, la figura 23B presenta una metafase con una buena dispersión de cromosomas presentan bandas con contraste bajo, la figura 23C se observan cromosomas definidos sin bandas.

Se realizaron una segunda ronda de placas variando el tiempo en la solución tripsina y el tiempo de tinción con Giemsa.

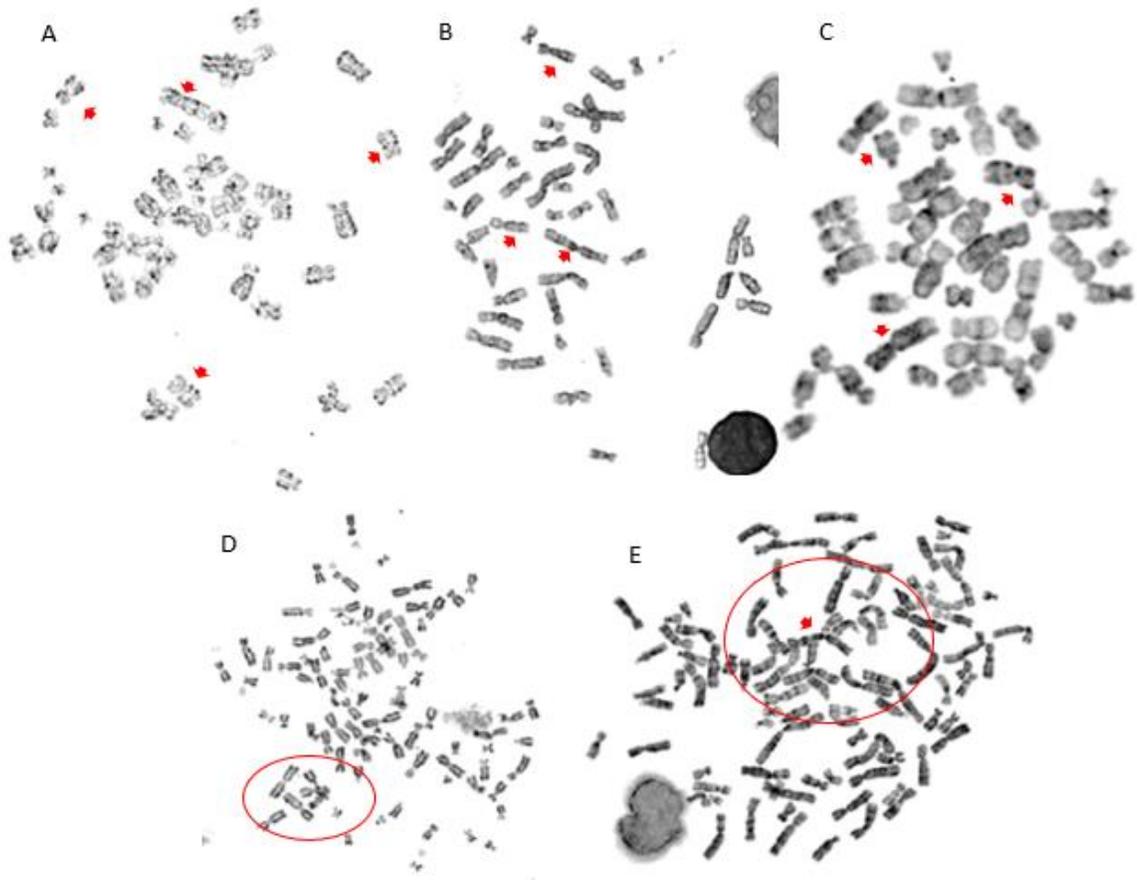
Tabla 8.
Tinción y bandeo de muestras de sangre periférica.

Muestra	Tiempo Solución Tripsina	Tiempo Tinción Giemsa	Observaciones
1	45 s	2 min	Pocas bandas
1	40 s	2.30 min	Pocas metafases
2	44 s	3 min	Bandas claras
2	43 s	2.10 min	Bandas quemadas
3	43 s	3 min	Bandas gruesas
3	44.5s	3 min	Bandas claras
4	45.5s	2.50 min	Bandas claras
4	45 s	3 min	Bandas quemadas
5	42 s	3 min	Bandas claras
5	43.5s	2 min	Pocas bandas
6	44 s	3 min	Bandas quemadas
6	42.5 s	2.40 min	Metafases superpuestas

En la segunda ronda de placas, se pudo observar bandas más claras y cromosomas más definidos.

Figura 24.

A) *Metafase con 45.5 s en tripsina y 2.50 min en tinción Giemsa; B) Metafase con 42 s en tripsina y 3 min en tinción Giemsa; C) Metafase en 44.5 s en tripsina y 3 min en tinción Giemsa; D) Metafase con más de 46 cromosomas; E) Metafase superpuesta con más de 46 cromosomas y cromosomas superpuestos.*

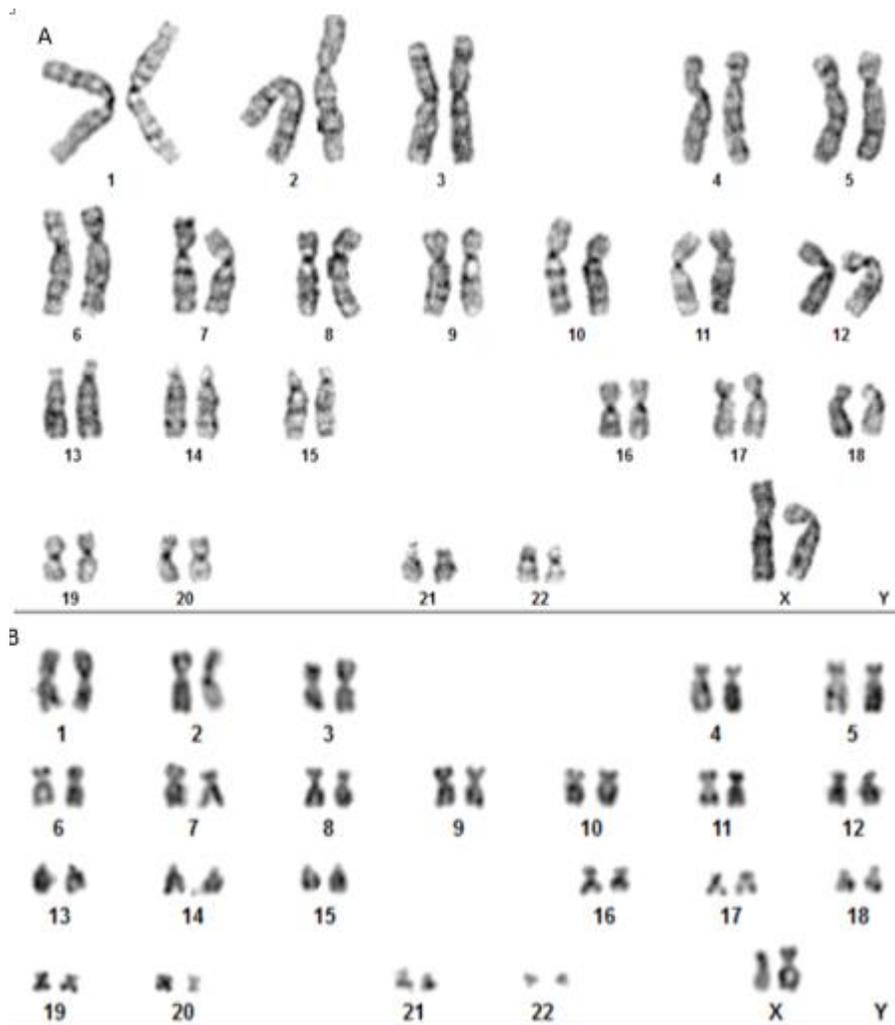


En la figura 24A se observan bandas sin embargo no son claras y definidas, la metafase presenta cromosomas gruesos se debe al tiempo de exposición en tripsina ya que un tiempo insuficiente provoca bandas con poco contraste. La figura 24B presenta cromosomas con una dimensión correcta, tienen una buena dispersión en la placa y sus bandas no se puede distinguir entre ellas. La figura 24C presenta una metafase con cromosomas gruesos y pequeños, sin embargo, estos se encuentran quemados debido al tiempo de exposición prolongado a la tripsina. Se encontraron varias metafases superpuestas, con más de 46 cromosomas y con bandas no definidas con se muestra en las figuras 24D y 24E.

Se obtuvo los siguientes cariotipos a partir de metafases con bandas claras, cromosomas definidos con tiempo en solución tripsina de 43 a 45 s y 2.40 a 3 min en tinción con Giemsa.

Figura 25.

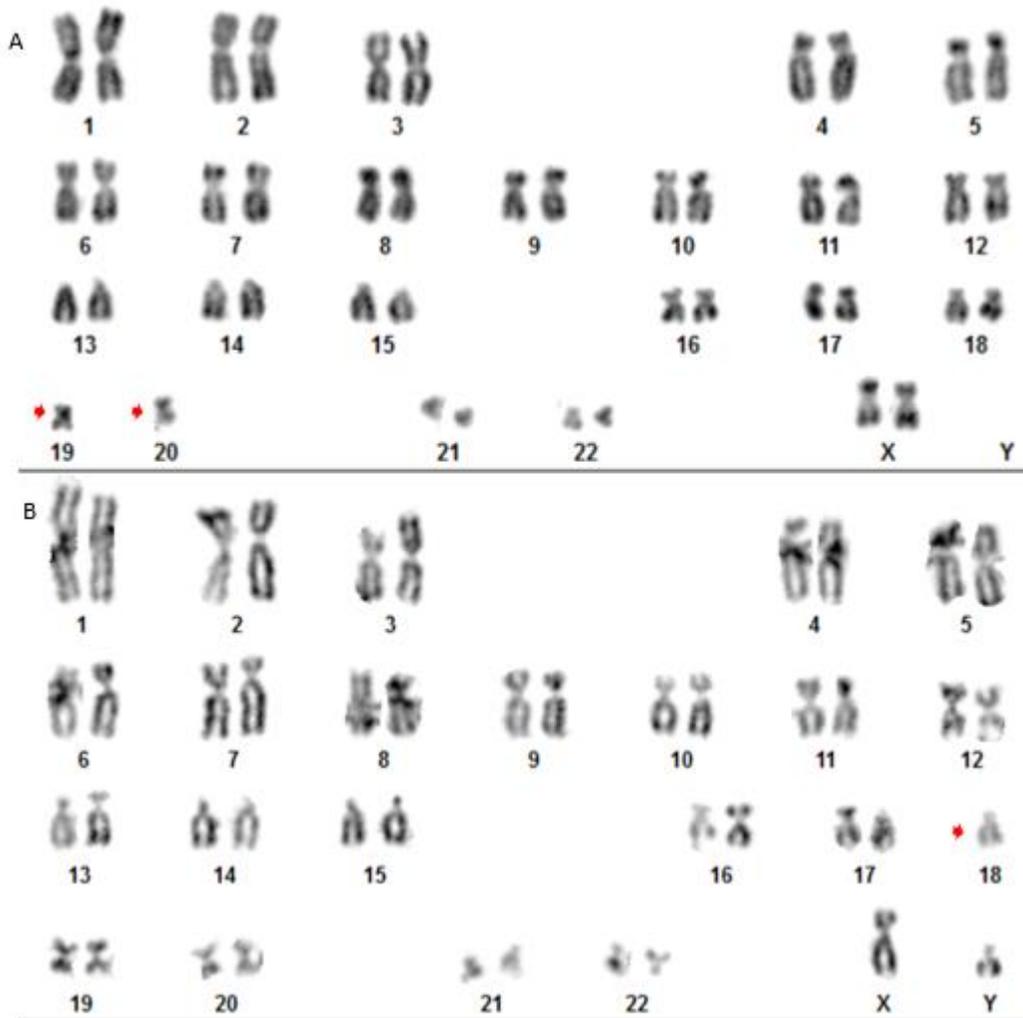
A) Se observa un cariotipo normal femenino con 46 cromosomas (46 XX) con un tiempo en solución tripsina 43 s y tinción Giemsa 2.45 min; B) Cariotipo femenino con 46 cromosomas (46XX), con un tiempo en solución tripsina 44.7 s y tinción Giemsa 2.40 min.



En los siguientes cariotipos se observa cariotipos con anomalías cromosómicas, ya que las muestras analizadas son de pacientes con cáncer (mieloma múltiple), presentan anomalías numéricas en su cariotipo.

Figura 26.

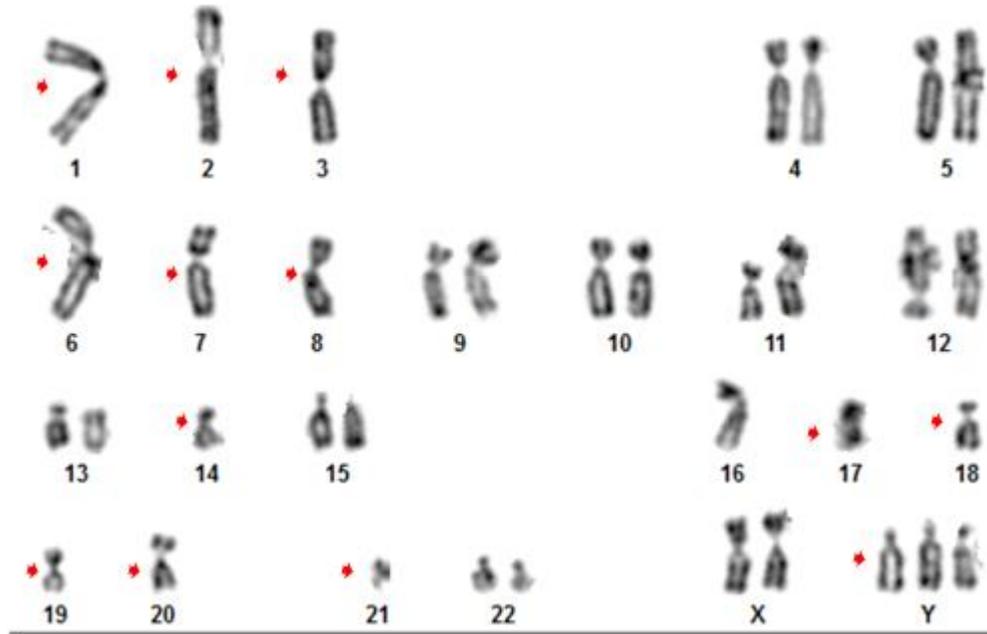
A) Cariotipo femenino, con anomalía numérica presenta 44 XX, -19, -20 con un tiempo en solución tripsina 43 s y tinción Giemsa 3 min, B) Cariotipo masculino, con anomalías numéricas presenta 45 XY, -18. con un tiempo en solución tripsina 44.5 s y tinción Giemsa 3 min.



En la figura 26 se observa un cariotipo con anomalías cromosómicas, presenta la ausencia de varios cromosomas, esto sucede en varias ocasiones. El paciente puede presentar alguna enfermedad de tipo neoplasia o en su defecto se debe a una mala extensión de la muestra en la placa, ya que los cromosomas se encuentran muy dispersos.

Figura 27.

Cariotipo masculino con anomalías numéricas, presenta 36 cromosomas (XXYYYY), -1, -2, -3, -6, -7, -8, -14, -16, -17, -18, -19, -20, -21. El tiempo en solución de tripsina fue de 44 s y en tinción Giemsa fue de 2.40 s.

**Ensayo cometa**

Se analizaron 15 muestras, por cada muestra se realizaron 3 placas. Para inducir daño en las células se usó H₂O₂ al 20%. Se colocó las capas de agarosa una noche anterior al ensayo, en la tabla 9 se observa las variaciones y observaciones que se obtuvieron:

Tabla 9.
Condiciones del ensayo cometa con variación en capas de NMP.

Muestra	Capas de NMP	H₂O₂ + Sangre (μL) (SP*)	SP + LMP (μL)	Observaciones
1	2, 1 capa 24 horas antes y 1 capa 1 hora antes	5 + 5	5 + 80	Ruido Pocas células
2	2, 1 capa 24 horas antes y 1 capa 1 hora antes	5 + 10	10 + 80	Ruido Hemolisis
3	2 capas 24 horas antes	10 + 20	5 + 160	Ruido Hemolisis
4	2 capas 24 horas antes	10 + 5	10 + 160	Ruido
5	1 capa 1 hora antes	10 + 10	10 + 160	Ruido Pocas células
6	1 capa 1 hora antes	5 + 20	5 + 80	Pocas células
7	2 capas 1 hora antes	20 + 5	10 + 80	No se observa células
8	2 capas 1 hora antes	20 + 20	10 160	Ruido Pocas células con halo
9	1 capa 1 hora antes	0 + 5	5 + 80	Células sin presencia de halo
10	2 capas 1 hora antes	0 + 10	10 + 160	Células sin presencia de halo

Nota: SP*: sangre + H₂O₂

Se hizo un cambio de marca de portaobjetos, debió a que las capas de agarosa en la fase de electroforesis se desprendieron de las placas. Se colocó los portaobjetos en etanol al 70% a -20 °C por 24 horas y la agarosa NMP se preparó un día antes del ensayo y se mantuvo en la estufa hasta su uso. En la tabla siguiente se detalla los resultados con los cambios anteriores mencionados.

Tabla 10.*Condiciones 2, ensayo cometa variación de capas de agarosa NMP y LMP*

Muestra	Capas de NMP	H₂O₂ + Sangre (μL) (SP)	SP + LMP (μL)	Observaciones
1	2 capas 24 horas antes	5 + 5	5 + 80	Ruido Células sin presencia de halo
2	2 capas 24 horas antes	10 + 10	10 + 80	Ruido
3	2 capas 24 horas antes	20 + 10	5 + 160	Células superpuestas Hemolisis
4	2 capas 24 horas antes	5 + 20	10 + 160	Ruido
5	2 capas 24 horas antes	0 + 5	5 + 80	Pocas células con halo
6	2, 1 capa 24 horas antes y 1 capa 1 hora antes	5 + 10	5 + 160	Pocas células con halo
7	2, 1 capa 24 horas antes y 1 capa 1 hora antes	10 + 5	10 + 160	Ruido Células superpuestas con halo
8	2, 1 capa 24 horas antes y 1 capa 1 hora antes	20 + 20	5 + 80	Hemolisis Pocas células
9	2, 1 capa 24 horas antes y 1 capa 1 hora antes	5 + 10	10 + 80	Células con presencia de halo
10	2, 1 capa 24 horas antes y 1 capa 1 hora antes	0 + 5	5 + 160	Pocas células

Las placas 1, 2, 4 y 7 presentaron ruido debió a la doble capa de agarosa NMP, para el siguiente ensayo se usó una capa de agarosa 24 horas antes del ensayo. Las placas 3 y 8 presentaron hemolisis celular, en las siguientes placas se usó solamente 5 y 10 μ L de H₂O₂, las placas 5,6, 8 y 10 presentaron pocas células por lo que para el siguiente ensayo se usó 80 μ L de agarosa LMP.

En la tabla 11 se evidencia las condiciones usadas con 1 capa de agarosa NMP colocada un día antes con los portaobjetos previamente colocados en etanol al 70 °C en -20 °C por 24 horas.

Tabla 11.

Condiciones del ensayo cometa con 1 capa de agarosa NMP.

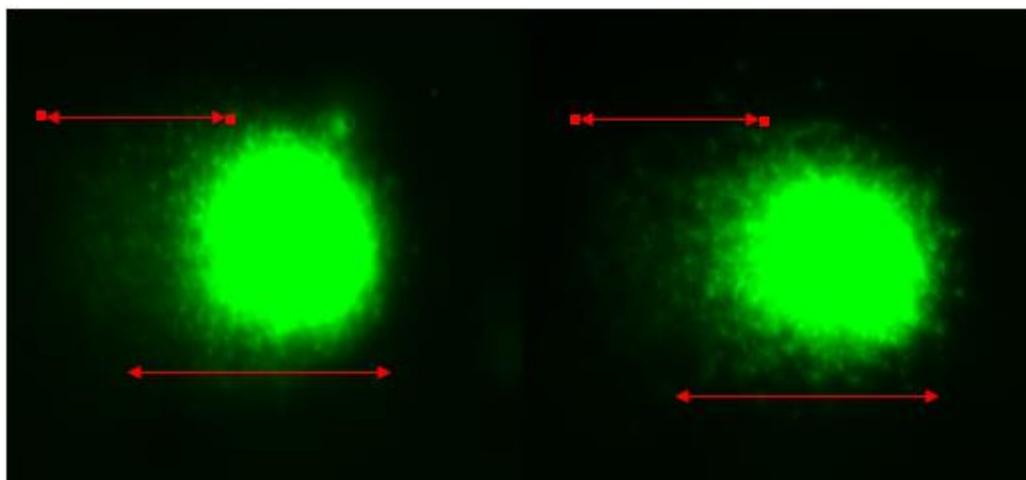
Muestra	H ₂ O ₂ + Sangre (μL)	SP + LMP	Observaciones
1	5 + 5	5 + 80	Células con halo
2	10 + 5	5 + 80	Hemolisis celular
3	5 + 10	10 + 80	Células con halo
4	10 + 10	10 + 80	Células superpuestas
5	0 + 5	5 + 80	Células sin halo

Los siguientes ensayos se realizaron con 1 capa de agarosa NMP colocada 1 noche anterior, de esta forma se evitó ruido en las imágenes. El tampón de lisis fue evaluado, se colocó el DMSO 10% y Triton X – 100 al 1% 12 minutos antes de la fase de lisis celular, sin embargo, las células no presentaron lisis celular. Se realizó una variación en el tampón de lisis, se añadió DMSO 10% y Triton X-100 1 hora antes de empezar el ensayo y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

En la figura 28 se observa células con presencia de halo con un tampón de lisis con las variaciones mencionadas. En las zonas señaladas se puede observar la presencia halo y cola, confirmando que las células presentan daño o rupturas de en la cadena de ADN.

Figura 28.

Células con presencia de halo, variación del tampón de lisis

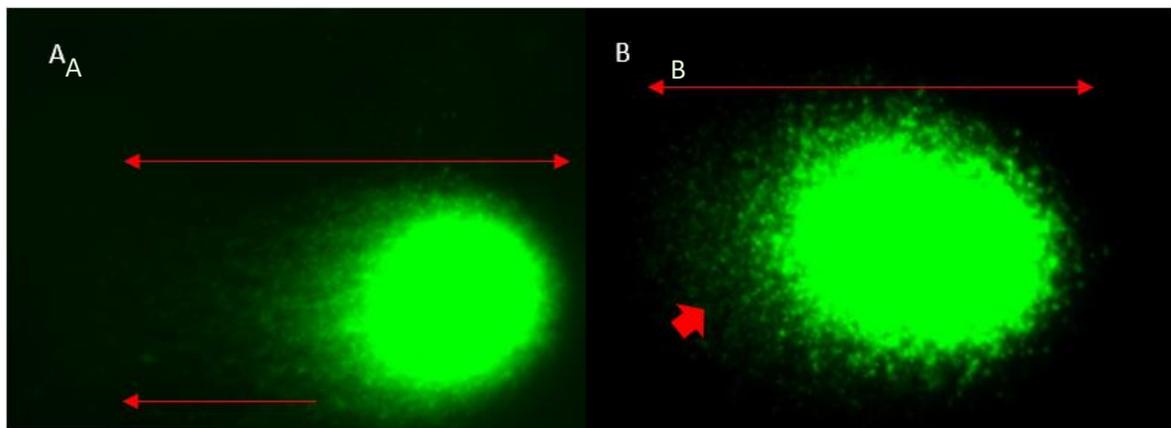


Nota: Tampón de lisis con DMSO 10% y Triton X-100 al 1% agregados 1 hora antes del ensayo y a 4 °C hasta su uso.

En la fase de denaturalización se usó una cámara de electroforesis previamente colocada a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad, se colocó las placas en la cámara evitando espacios entre sí. En la figura 29 de evidencia dos tiempos distintos de corrida de electroforética, 20 min y 30 min. En la figura 29A se observa la presencia de halo y cola mientras que en la figura 29B se observa la presencia solo de halo en la célula.

Figura 29.

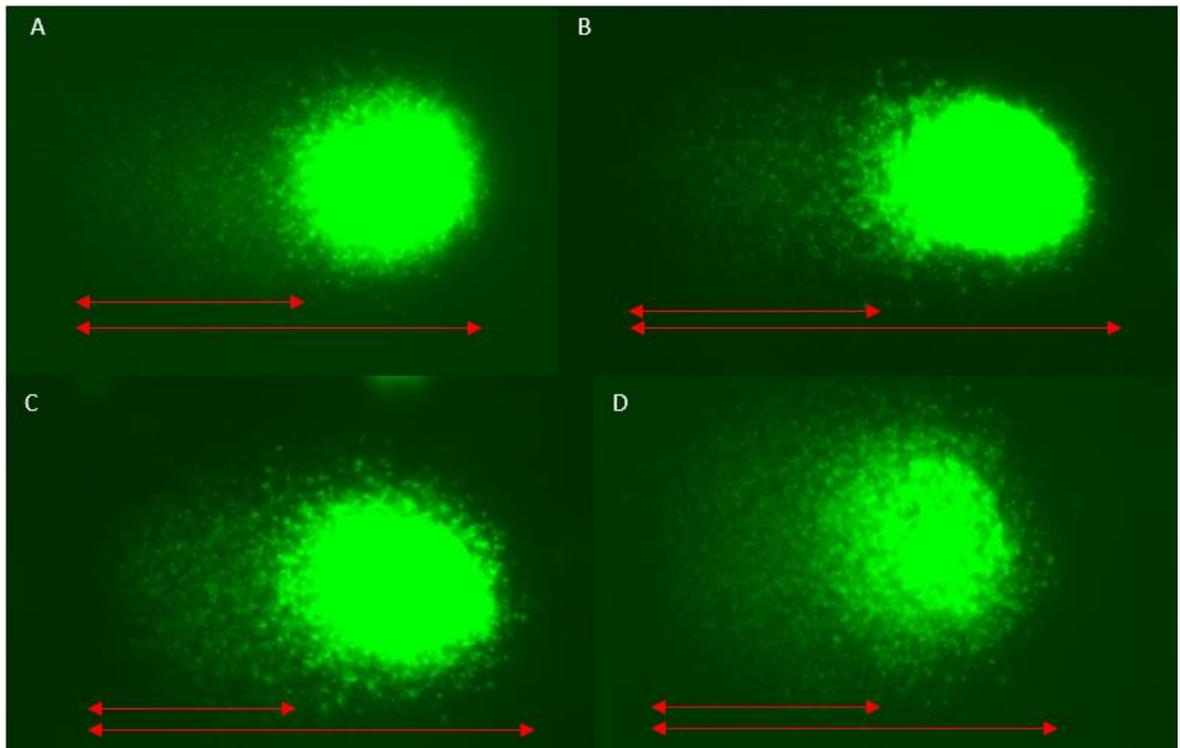
Células con presencia de halo, variación de condiciones de electroforesis. A) Condiciones de electroforesis 25V, 300 mA y 20 min; B) Condiciones de electroforesis 25V, 300 mA y 30 min.



Una de las condiciones más importantes en la fase de electroforesis es la temperatura, debe realizarse a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se puede colocar la cámara dentro de una bandeja de hielo o dentro del refrigerador sin existir variaciones en su resultado.

En la figura 30 se observa células con la presencia de halo y cola, esto se obtuvo con las variaciones mencionadas anteriormente.

Figura 30.
Células con presencia de halo y cola.



En la figura se observa células en la presencia de halo y cola, sin embargo cabe señalar que las condiciones de electroforesis depende del tipo de célula y el daño que se espera encontrar.

Revisión bibliográfica sobre variantes genéticas del cáncer de tiroides.

En la siguiente tabla 12 se presenta investigaciones relevantes a variantes genéticas en cáncer de tiroides, genes, polimorfismos, exones entre otros en varias poblaciones a nivel mundial.

Tabla 12.

Revisión bibliográfica de variantes genéticas en el cáncer de tiroides.

Autor, revista, año	País	Tipo de estudio	Población	Resultados	Conclusiones
Pérez, G Universitat Autònoma de Barcelona 2006	España	Descriptivo	458 pacientes adultas.	Gen XRCC1, polimorfismo <i>Arg280His</i> , gen TG polimorfismo.	El polimorfismo <i>Arg280His</i> de XRCC1 se asoció con un incremento del riesgo de cáncer de tiroides. Mutaciones en el gen TG son relevantes en la neoplasia de tiroides.
Acquaviva, G et al., Histopathology, 2018	Italia	Bibliográfico	-----	Alteraciones en gen BRAF <i>pV600E</i> , mutaciones puntales en RAS y oncogén RET-PTC.	Las alteraciones moleculares son biomarcadores útiles para el diagnóstico y posibles objetivos de tratamiento del carcinoma de tiroides.
Wohlk, N. Rev Méd Chile 2005	Chile	Descriptivo	50 pacientes portadores de CMT y 50 personas sanas.	Similitud en alelos G691S, L769L y S904S en los dos grupos de estudio. Sobre expresión del polimorfismo S836S en cáncer medular de tiroides.	Los polimorfismos G691S, L769L y S834S no son relevantes en el cáncer medular de tiroides en la población chilena.

Autor, revista, año	País	Tipo de estudio	Población	Resultados	Conclusiones
Madrigal, P. <i>et al.</i> Revista Médica México, 2015	México	Descriptivo	159 pacientes	Polimorfismo <i>PD1134A</i> del gen TJP1 está presente en los pacientes con cáncer de tiroides en población mexicana con ascendencia zapoteca.	El polimorfismo <i>PD1134A</i> del gen TJP1 es un marcador en la población mexicana y se asocia en la neoplasia de tiroides.
Rodríguez, J. Sciendo, 2018.	México	Bibliográfico	-----	Activación de oncogenes RAS, BRAFF y RET/PTC.	El cáncer de tiroides es una enfermedad poli genética resultado de la interacción de varios factores genéticos como polimorfismos o mutaciones.
Fang, Yi, <i>et al.</i> Cellular Physiology and Biochemistry, 2018	China	Descriptivo	11 pacientes con cáncer de tiroides papilar	Los genes alterados con mayor frecuencia son, BRAF, RAS y p53.	La vía de señalización del p53 está involucrada en la progresión y tumorigénesis en el cáncer papilar de tiroides.
Peralta, N. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito 2015	Ecuador		50 pacientes con cáncer de tiroides	Los polimorfismos <i>Arg1980Trp</i> y <i>Ser734Ala</i> del gen TG no se encuentran en relación con la progresión de la enfermedad en la población ecuatoriana.	La variante genética <i>Ser734Ala</i> tiene mayor probabilidad de presentar cáncer de tiroides papilar.

Capítulo V: Discusión

En los últimos años, investigaciones han demostrado que la raza o etnia es de gran impacto en la incidencia, la supervivencia y la respuesta a fármacos en el cáncer. Guerrero (2018) , menciona que pese a la influencia de la etnia en el cáncer y en la calidad de la atención médica, este aspecto no se aborda en la investigación oncológica.

Demostrando que, en modelos oncológicos derivados de pacientes, el 48% no tiene registro de su donante en relación con la etnia; el 37.6% proviene de blancos, de asiáticos el 10% y de afroamericanos e hispanos un 4.4%. El cáncer de tiroides crece alarmantemente a nivel mundial, sin embargo, no existe información en Latinoamérica, y esta neoplasia ocupa el primer lugar entre mujeres en la región.

Salazar, (2019), en su investigación menciona que durante 16 años (2001 – 2016) en Ecuador se reportaron 23 632 casos y 1539 muertes por cáncer de tiroides con 96 muertes por año. El país presenta la tasa más alta de cáncer de tiroides, es una enfermedad frecuente, pero con una tasa de mortalidad baja. En Ecuador la tasa de incidencia es de 165 casos por 100 000 habitantes según The Global Cancer Observatory perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el carcinoma de tiroides en el país tiene una incidencia de 19%, 40.9% son mujeres de acuerdo con datos del Instituto Ecuatoriano de Estadística y Censos (INEC).

Corral, (2018), menciona en su investigación que desde 1985 hasta 2013 la neoplasia de tiroides es más frecuente en mujeres con una tendencia a aumentar, de 10 a 35 en los últimos 10 años, el cáncer de tiroides más frecuente es el papilar, esto se confirma con Sierra, (2016), concluye que este cáncer está aumentando rápidamente en los países de Latinoamérica y el cáncer tiroideo papilar fue el más diagnosticado en Ecuador, Colombia, México, Perú y Panamá. Lortet *et al.*, (2019), confirma que existen tasas muy altas de cáncer de tiroides en país de ingresos medios o bajos, y una tasa de mortalidad baja, sin embargo, existe un sobrediagnóstico de esta neoplasia.

En la década de los 50's Sajiro Makino, Albert Levan y George Klein en su investigación demostraron que en líneas celulares cancerígenas son propensas a ser mitóticamente inestable y encontraron números cromosómicos altamente variables.

El análisis citogenético de enfermedades neoplásicas es importante para su diagnóstico y tratamiento adecuado y temprano. Desde aproximadamente el 2015 Roman, (2017), menciona que se trata de mitigar el sobrediagnóstico en el alarmante crecimiento de la incidencia del cáncer de tiroides para realizar un mejor diagnóstico y tratamiento. La Agencia Internacional para la investigación del Cáncer menciona que, en Australia, Francia, Italia y EE. UU. en los últimos 30 años del 70 al 80% de pacientes con cáncer papilar de tiroides es sobrediagnósticos. Marzo y Vela, (2018), menciona que en Latinoamérica en el periodo de 2003-2007 el 90% de los casos de cáncer papilar de tiroides fueron sobrediagnóstico.

Albert Levan en la década de los cincuenta descubrió el efecto de la colchicina como una sustancia capaz de inhibir la división celular (Tamar et al., 2008), el Colcemid es un análogo sintético de la colchicina que inhibe la mitosis. En la tabla 11 se establece las variaciones que se obtuvieron en el tiempo de incubación de Colcemid, Howe *et al.*, (2014), menciona que varios pasos en el ensayo son cruciales para obtener metafases de alta calidad y cromosomas bien dimensionados y con una morfología adecuada, con un tiempo de incubación de 25 minutos se observaron cromosomas largos y no definidos como se observa en las figuras 18 y 19, lo que concuerda con Howe en su investigación ya que tiempos de incubación insuficientes producen cromosomas largos y no definidos, y presencia de pocas metafases.

En la figura 20, se observan una metafase con cromosomas cortos en un tiempo de incubación de 60 minutos, Huacuja, (2005), menciona que esto se debe a que tiempos de incubación largos con Colcemid producen metafases superpuestas con cromosomas cortos y gruesos que son difíciles de analizar.

Uno de los aspectos más importantes en el bandeo GTG es tiempo de exposición a la solución de tripsina, en la investigación de Hwang, (2013), una exposición prolongada a tripsina da cromosomas hinchados y bandas gruesas, en las figuras 22, 23 y 24 se observa cromosomas gruesos y con bandas no definidas lo que concuerda con la investigación previa mencionada, ya que su tiempo de exposición a tripsina fue de 45s. Tiempos de exposición cortos a tripsina producen bandas con poco contraste e indistinguibles, (Villaverde, 2000), el tiempo de exposición a tripsina varía dependiendo de la muestras y las condiciones de recolección.

Se obtuvo bandas claras y definidas con un tiempo de exposición de 45.5 s a la solución de tripsina y un tiempo de tinción de 2.50 s en Giemsa con se observa en las figuras 25, 26 y 27; el ángulo en el que se coloca la sedimentación celular resuspendida debe ser de 45 °C ya que así se da una extensión adecuada en la placa, Novillo, (2010), menciona que la placa debe estar a 45° y se debe colocar la muestra desde lo más alto posible; para lograr una buena dispersión en la placa y obtener metafases no superpuestas con se observa en la figura 28.

Los ensayos y pruebas citogenéticas son de suma importancia en la investigación oncológica, específicamente el análisis cariotípico ya que se puede evidenciar alteraciones cromosómicas como la transformación de una célula normal a una célula maligna, Muñeton y Ramírez, (2002), mencionan que la citogenética del cáncer se ha especializado en identificar los cambios numéricos y estructurales de cromosomas en diferentes neoplasias.

Realizar un buen cariotipo de una neoplasia hoy en día es esencial para un diagnóstico temprano y pronóstico favorable para el paciente, el cariotipaje permite establecer alteraciones cromosómicas que sirven de biomarcadores en varios tipos de cáncer. Becerra y Bautista, (2020), corroboran que la estandarización de las técnicas de cariotipaje, específicamente, la técnica de bandedo GTG permite la diferenciación y organización de los cromosomas de manera más efectiva.

Actualmente estamos expuestos a agentes físicos y químicos que afectan al ADN, las pruebas de genotoxicidad son herramientas útiles para determinar daño y alteraciones en el material genético, una de las pruebas más utilizadas es el ensayo cometa (Murillo, 2019).

Collins (2004), Azqueta y colaboradores (2013), mencionan que la sensibilidad y especificidad del ensayo cometa depende de las cantidad de muestras analizadas y el daño que se espera encontrar, sin embargo, mencionan que se compara con la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con una sensibilidad del 100% y especificidad del 98.9%.

El ensayo de electroforesis alcalina de células individuales embebidas en microgel, o ensayo cometa es un ensayo simple, sencillo, económico y rápido que se puede aplicar a tipo de células para medir y determinar rupturas de cadena de ADN (Ansoar-Rodríguez, Fontanetti, & Christofolletti, 2015); Gonzáles, (2004), menciona que este ensayo consiste en analizar individualmente células que son sometidas a una lisis y a electroforesis, durante esta electroforesis los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo formando una cola.

El cáncer es una enfermedad multifactorial con tasas de mortalidad e incidencia altas, Prieto, (1999), menciona en su investigación que establecer los niveles de daño al ADN en individuos y poblaciones es importante para establecer el riesgo de sufrir cáncer y existen muchas pruebas y ensayos para determinarlo pero con un costo elevado ya que a mayor sensibilidad, mayor costo y el ensayo cometa es una prueba rápida, de bajo costo y más sensible que permite determinar roturas de simple cadena y sitios lábiles. Siendo presentado como una nueva prueba de diagnóstico temprano, con confiabilidad del 98% y sensibilidad del 75%, lo que se corrobora con el estudio de Fracasso, *et al.*, (2004).

Una de las variables que afectan a este ensayo es la concentración y las capas de agarosa en la placa, se colocaron al inicio del ensayo 2 capas de agarosa lo que ocasiono ruido de fondo, Zuñiga (2009), en su investigación menciona que las capas de agarosa tanto NMP (0.6%) como LMP (0.5%) aseguran un soporte estable para la manipulación de la células y obtener mínimo ruido en la visualización, lo que corrobora nuestros resultados. La aplicación de una sola capa obtuvo menos ruido de fondo.

La capa de agarosa LMP que contiene las células, se aplicaron dos diluciones obteniendo pocas células en una mayor cantidad de agarosa, Razo (2011), establece que esto se debe a que en aproximadamente 10 μ l de muestra están presentes 10 000 células y al mezclarlas con una mayor cantidad de agarosa no se visualiza un mayor número de células en la placa. Si se utiliza una mayor cantidad de células se dificulta la visualización ya que puede existir células superpuestas.

Otra variable importante en el bioensayo cometa es la fase de lisis celular, Murillo (2019), menciona que no es necesario añadir DMSO a la solución de lisis, sin embargo, en nuestro ensayo se evidencio que se debe añadir 1 hora antes a la solución de lisis. En investigaciones antes mencionadas, se corrobora que el uso de DMSO en el ensayo es para minimizar el daño causado por los iones de hierro en la lisis de los eritrocitos. Esto corrobora Zúñiga (2009) en su investigación menciona que el DMSO previene el daño en el ADN inducido por la oxidación.

El tiempo en la fase de electroforesis es otra variante importante en el ensayo cometa, el tiempo, amperaje y voltaje depende del tipo de muestra a analizar. Se realizó una electroforesis alcalina ya que se puede observar mayor daño en el ADN, Rodríguez (2016) menciona que la electroforesis alcalina es conocida como el método Sing ya que emplea un pH > 13 y detecta rupturas de simple y doble cadena de ADN y sitios alcalinos lábiles.

En la electroforesis del ensayo cometa se usa voltajes bajos ya que solo se necesita migrar milímetros para obtener movilización del ADN y por lo tanto formación del cometa o cola en la célula, Zúñiga (2009), establece que las condiciones óptimas de voltaje, amperaje y tiempo de electroforesis depende de la migración de grupos controles y el rango de migración en la célula tratada. Las condiciones originales descritas por Sing son de 25V, 300 mA y 20 minutos, estas condiciones también son descritas en la mayoría de los estudios, pero tanto el tiempo de electroforesis puede variar dependiendo del tipo de célula que se esté analizando como el daño que se quiera detectar. Dhawan, (2007), usó un tiempo de electroforesis de 30 minutos y obtuvo células con cometas definidos y menciona que la migración difiere para cada tipo de célula. Hable de la calidad de la muestra y que no es invasiva

Una característica importante en la progresión del cáncer es la capacidad de las células tumorales para evitar su destrucción, Ferrarri (2019), menciona que en un ambiente tumoral las células inmunes secretan citocinas y quimionas proinflamatorias que aumentan la proliferación de células tumorales; el patrón molecular que generan las quimionas y citocinas son un punto clave en la biología del cáncer. Un conocimiento más amplio en las variantes genéticas en el cáncer de tiroides es un objetivo importante de estudio ya que permite establecer nuevas estrategias terapéuticas.

Por su parte, Khatami y Tavangar (2018), mencionan que es necesario comprender la patología molecular del cáncer de tiroides y el papel que ocupa las vías de señalización y reordenamientos cromosómicos en la progresión de esta enfermedad. En la revisión bibliográfica encontramos que Pérez (2006), estudio en una población española con cáncer de tiroides polimorfismos genéticos relacionados con esta neoplasia; los polimorfismos representan alrededor del 80% de las variantes en una secuencia y estos pueden afectar genes que regulan el metabolismo, ciclo celular y reparación del ADN.

En el cáncer de tiroides los polimorfismos no han sido explorados y no se conoce la posible influencia de estos en la susceptibilidad de la enfermedad, el gen XRCC1 está involucrado en la reparación de roturas de simple cadena e interactúa con otras proteínas de reparación, el polimorfismo *Arg280His* no ha sido estudiado en este gen con relación al cáncer de tiroides sin embargo en estudios relacionados con cáncer de pulmón se encontró que los individuos con este polimorfismo tuvieron un 80% más de riesgo. En cáncer de vejiga y esófago se encontró que esta variante incrementa el riesgo de padecer la enfermedad, sin embargo no está claro si este polimorfismo influye en el cáncer de tiroides, Pérez (2006), menciona que en la población española se encontró este polimorfismo y se puede asociar con riesgo a padecer cáncer de tiroides; cabe recalcar que en el estudio se menciona que los resultados en otra población son diferentes y no se puede concluir que este polimorfismo esté presente a nivel mundial, por su zona geográfica por su raza o etnia.

El desequilibrio hormonal en la glándula tiroides es una de las principales causas de desarrollar enfermedades en esta, las variantes del gen TG puede ocasionar alteraciones estructurales y funcionales en la proteína, se asocian con enfermedades autoinmunes. En la investigación de Pérez, (2006), el polimorfismo *Gln2511Arg* se encontró que incrementa la susceptibilidad de desarrollar cáncer de tiroides en la población estudiada.

En Ecuador, Peralta (2012), analizo en 50 pacientes con cáncer de tiroides los polimorfismos *Ser734Ala* y *Arg1980Trp* del gen TG; estos polimorfismos interfieren en la síntesis de cisteína y son aceptores de yodotirosina y cambios en estos podrían predisponer a patologías de la glándula tiroides. Peralta (2012), no encontró relación entre estas variantes genéticas y la progresión de cáncer de tiroides diferenciado, sin embargo, no se acepta por completo esta hipótesis ya que la variante *Ser734Ala* tiene una mayor probabilidad de presentarse en otros tipos de cáncer de tiroides.

Acquaviva (2018), en su investigación menciona que el la mutación más común en el gen BRAFF es p.V600E, esta mutación está presente en 90% de los casos de cáncer papilar de tiroides y es un potente marcador para su diagnóstico. La mutación p.V600E es un evento tumorigénico temprano que induce la pérdida de diferenciación y promueve la progresión del cáncer.

El oncogén RET está asociado con la exposición a la radiación ya sea ambiental o terapéutica, está presente en el 80% de los cánceres de tiroides en su mayoría en el papilar, Acquaviva (2018), menciona que reordenamientos del oncogén RET se encontraron en pacientes expuesto a altos niveles de radiación esto concuerda con Rodríguez y Zerón (2019), que mencionan que RET/PTC conduce a una proliferación celular descontrolada y los reordenamientos de este oncogén están relacionados a factores ambientales como la exposición a radiación.

El desarrollo y la progresión del cáncer papilar de tiroides esta relaciona con la acumulación de alteraciones genéticas, Fang y colaboradores (2018), encontraron en su estudio que el gen BRAF está presente en el 54,5% de casos de PTC ya que es la mutación más común en este tipo de cáncer y sus variaciones activan la progresión agresiva; además relaciona los oncogenes RAS y p53. La vía de señalización del p53 tiene un papel importante en la regulación de la proliferación celular, el ciclo celular y la apoptosis, en el estudio antes mencionado se concluye que alteraciones en la vía del p53 promueve la tumorigénesis en el cáncer folicular de tiroides.

Wohlk y colaboradores (2005), establecen que mutaciones del oncogén RET predominan en un 50% en el PTC, en investigaciones previas encontraron similitudes en los alelos *G691S*, *L769L* y *S904S* en cancer de tiroides en poblaciones alemanas y estadounidenses; en su estudio en la población chilena encontraron estas similitudes en 8 de 9 pacientes estudiados. Sin embargo, en Polonia, Italia y Francia no se ha encontrado relación de estos polimorfismos con el cáncer de tiroides, Wohlk (2005), concluye que estas variantes alélicas no cumplen un rol como factor de riesgo en la neoplasia de tiroides.

Capítulo VI: Conclusiones

El tiempo de incubación en Colcemid es un punto clave en la estandarización del protocolo de cariotipaje, tiempos insuficientes producen menos extensiones de metafases y cromosomas superpuestos y largos y tiempos de incubación largos darán como resultados cromosomas cortos y gruesos difíciles de analizar. El tiempo óptimo en este ensayo fue de 40 minutos obteniendo cromosomas claros y diferenciados. La preparación de la placa es fundamental para una extensión correcta, se debe colocar el portaobjetos inclinado con un ángulo de 45° y colocar la micropipeta lo más alto posible para que exista una dispersión correcta de los cromosomas. La exposición a tripsina es un aspecto importante en el bando GTG, se obtuvo bandas claras y definidas con un tiempo de exposición a tripsina de 45.5 s.

El ensayo cometa es una prueba que permite determinar el daño en el ADN, es una prueba rápida, sensible y de bajo costo. La preparación de los portaobjetos es importante, colocar en etanol al 70% a -20°C 24 horas antes del ensayo permita una buena adherencia de la capa de agarosa NMP al portaobjetos. Añadir DMSO 1 hora antes a solución de lisis y llevarla a -4°C antes del ensayo, el DMSO minimiza el daño causado por los iones del hierro en la lisis de los eritrocitos. El factor de mayor influencia en el ensayo cometa es la fase de electroforesis, las condiciones óptimas de voltaje, amperaje y tiempo de electroforesis depende de la migración de grupos controles. Las condiciones usadas fueron 25V, 300 mA y 30 minutos.

Las variantes genéticas en el cáncer de tiroides permiten establecer nuevas dianas terapéuticas para un diagnóstico temprano y oportuno. Los oncogenes BRAF, RAS, RET y las alteraciones moleculares están relacionados en la progresión del cáncer de tiroides.

Capítulo VII: Recomendaciones

Para evitar ruido en la observación de las placas en el ensayo cometa, se puede usar mayor tiempo en la fase de neutralización y usar una sola capa de agarosa NMP, calentar la agarosa minutos antes de su uso y mantenerla en la estufa.

Se debe mantener la cámara de electroforesis dentro del enfriador y evitando la luz, colocar las placas en la cámara evitando espacios y colocar las soluciones de neutralización y electroforesis a -4°C hasta su uso. Colocar los portaobjetos en la estufa antes del ensayo para una mejor adherencia de la muestra.

Preparar soluciones nuevas de tripsina y giemsa en cada ensayo para evitar ruido de fondo en la visualización. Es preferible usar muestras frescas para obtener mejores resultados. El cariotipaje es una herramienta útil, se la puede usar para determinar o confirmar enfermedades neoplásicas.

Se recomienda realizar después de estos ensayos pruebas para marcadores moleculares específicos como BRAF, RET, TG para confirmar el diagnóstico.

Referencias

- Acquaviva, G., Visani, M., Repaci, A., Rhoden, K. J., de Biase, D., Pession, A., & Giovanni, T. (2018). Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology*, *72*(1), 6–31.
<https://doi.org/10.1111/his.13380>
- Álvarez Montané, I. (2014). Comportamiento epidemiológico del cáncer de tiroides en pacientes con supervivencia de 20 años y más. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, *61*(3), 175–184.
- Anda, E., Pineda, J., Toni, M., & Galofré, J. C. (2016). Enfermedad nodular tiroidea. *Medicine (Spain)*, *12*(13), 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.06.001>
- Ansoar-Rodríguez, Y., Fontanetti, C. S., & Christofolletti, C. A. (2015). Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, *46*(1), 51–62.
- Azqueta, A., Arbillaga, L., López De Cerain, A., & Collins, A. (2013). Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*, *28*(3), 271–277. <https://doi.org/10.1093/mutage/get002>
- Becerra, J. A., & Bautista, J. (2020). Citogenética del cáncer; Alteraciones cromosómicas útiles para diagnóstico oportuno y pronóstico en neoplasias linfoproliferativas. *Revista de La Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia*, *9*(1), 25–54.
- Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, *7*(1), 54–86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>
- Brandan, N., Llanos, I., Horak, F., Tannuri, H., & Rodríguez, A. (2014). *Hormonas Tiroideas*.
- Bueno, M. (2011). Chromosomes as Vehicle in Organization and Transmission of Characters.

Laboratorio Citogenética, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia., 16, 43–60.

Cajamarca-Barón, J. H. (2014). El cáncer y su impacto en salud pública. *MedUNAB*, 17(1), 41–45.

<https://doi.org/10.29375/01237047.1965>

Calasanz, M. (2001). Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 24(SUPPL. 1), 17–29.

Carbone, A. (2020). Cancer classification at the crossroads. *Cancers*, 12(4), 10–15.

<https://doi.org/10.3390/cancers12040980>

Celano, C., & Airb, S. (2016). Manual de enfermería Oncológica. *Instituto Nacional Del Cáncer*.

Cha, Y. J., & Koo, J. S. (2016). Next - generation sequencing in thyroid cancer. *Journal of Translational Medicine*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1074-7>

Chala, A., Pava, R., Franco, H., Álvarez, A., & Franco, A. (2013). Criterios ecográficos diagnósticos de neoplasia maligna en el nódulo tiroideo: correlación con la punción por aspiración con aguja fina y la anatomía patológica Ultrasound diagnostic criteria of malignancy in a thyroid nodule: correlation with fine needle. *Revista Colombiana de Cirugía*, 28(1), 15–23.

Chiganer, G., Ghersevich, S., Sánchez, A., & Novelli, J. L. (2011). Biología molecular en el cáncer de tiroides. *Revista Medica de Rosario*, 77(3), 147–156.

Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

Cueva, P., Yépez, J., & Tapuri, W. (2559). *Epidemiología del cáncer en Quito, 2011-2015*. *Journal of*

Visual Languages & Computing (Vol. 11). Retrieved from https://www.m-culture.go.th/mculture_th/download/king9/Glossary_about_HM_King_Bhumibol_Adulyadej's_Funeral.pdf

Descailleaux, J., & Velasquez, M. (2000). Mutaciones del cromosoma X en pacientes del sexo femenino del servicio académico asistencial de genética humana de la UNMSM.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Pandey, A. K., & Parmar, D. (2007). PROTOCOL FOR THE SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS / COMET ASSAY FOR RAPID GENOTOXICITY ASSESSMENT Prepared by : *Electrophoresis*, 17(3), 1–10.

Díez, J. J., Galofré, J. C., Oleaga, A., Grande, E., Mitjavila, M., & Moreno, P. (2016). Consensus statement for accreditation of multidisciplinary thyroid cancer units. *Endocrinología y Nutrición*, 63(3), e1–e15. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2015.07.005>

Drets, M. (2016). Los orígenes de la genética y la citogenética humana clínica en el Uruguay. *Manuales de La Facultad de Medicina, Universidad de La República, Uruguay*, 2(2), 8–33.

Fang, Y., Ma, X., Zeng, J., Jin, Y., Hu, Y., Wang, J., ... Cao, C. (2018). The Profile of Genetic Mutations in Papillary Thyroid Cancer Detected by Whole Exome Sequencing. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(1), 179–195. <https://doi.org/10.1159/000493966>

Fernández, J. (2019). *Validación de la punción aspiración con aguja fina guiada por ecografía en el diagnóstico de cáncer de tiroides. Hospital José Carrasco Arteaga, Cuenca, Ecuador, 2017.* Universidad de Cuenca.

Ferrari, S. M., Fallahi, P., Galdiero, M. R., Ruffilli, I., Elia, G., Ragusa, F., ... Antonelli, A. (2019). Immune and inflammatory cells in thyroid cancer microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms20184413>

- Fracasso, M. E., Franceschetti, P., Doria, D., Talamini, G., & Bonetti, F. (2004). DNA breaks as measured by the alkaline comet assay in exfoliated cells as compared to voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: A study of 105 subjects. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *564*(1), 57–64.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.07.010>
- Francisca Ugarte, P., Hernán García, B., & Ethel Codner, D. (2004). Nódulo tiroideo en el niño. *Revista Médica de Chile*, *132*(10), 1256–1257. <https://doi.org/10.4067/s0370-41061982000100052>
- Galofré, J. C., Pineda, J., Toni, M., & Anda, E. (2016). Tiroiditis. *Medicine (Spain)*, *12*(13), 742–753.
<https://doi.org/10.1016/j.med.2016.06.004>
- García-Sagredo, J. M. (2008). Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1779*(6–7), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.05.003>
- García, C. (2016). Fisiología tiroidea. *Med Int Méx*, *32*(5), 569–575.
- Gartler, S. M. (2006). Humans : a Brief History. *Nature Reviews. Genetics*, *7*(August), 655–660.
<https://doi.org/doi10.1038/nrg1917>
- Gionfra, F., De Vito, P., Pallottini, V., Lin, H.-Y., Davis, P. J., Pedersen, J. Z., & Incerpi, S. (2019). The Role of Thyroid Hormones in Hepatocyte Proliferation and Liver Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(August). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00532>
- Gomez, E. (2020). CARIOTIPO. *Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas*, (May).
- González, D. J., Espinosa, G., Ilizaliturri, C., Mejía, J., Jasso, Y., & Díaz, F. (2004). Ensayo cometa en

fauna terrestre. *Universitat Autònoma de Barcelona*, (1988), 107–126.

González, L., Sáenz, E., Rodríguez, S., & Porras, O. (2002). Cuantificación de linfocitos T mediante rosetas con globulos de carnero y respuesta mitogenica a lectinas. *Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza En Nutrición y Salud*, 37–42.

Guerrero, S., López-cortés, A., Indacochea, A., García-, J. M., Zambrano, A. K., Cabrera-andrade, A., ... Paz-y-miño, C. (2018). Analysis of Racial / Ethnic Representation in Select Basic and Applied Cancer Research Studies. *Scientific Reports*, (July), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32264-x>

Herbergs, A. (2019). Clinical Implications and Impact of Discovery of the Thyroid Hormone Receptor on Integrin $\alpha v \beta 3$ – A Review. *Frontiers in Endocrinology*, 10(August). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00565>

Herrera, M., & Bernal, E. (2008). Estudio morfológico del cultivo a largo plazo de folículos aislados y cerrados de tiroides de cerdo., 13(3), 49–60.

Howe, B., Umrigar, A., & Tsien, F. (2014). Chromosome Preparation From Cultured Cells, (January), 3–7. <https://doi.org/10.3791/50203>

Huacuja, L., Miranda, M. L., Covarrubias, L. I., Reyes, A., & Jiménez, M. (2005). Biología de la Reproducción. *Inmovilización – Aglutinación Espermática y Efecto Antifertilizante En La Rata Con El Extracto Natural de Plantas Del Género Kalanchoe.*, 501–529.

Hwang, S. M., See, C. J., Choi, J., Kim, S. Y., Choi, Q., Kim, J. A., ... Lee, D. S. (2013). The application of an in situ karyotyping technique for mesenchymal stromal cells: A validation and comparison study with classical G-banding. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(12), e68-6. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.133>

- Idikio, H. A. (2011). Human cancer classification: A systems biology-based model integrating morphology, cancer stem cells, proteomics, and genomics. *Journal of Cancer*, *2*(1), 107–115. <https://doi.org/10.7150/jca.2.107>
- Jiang, Y., Wang, R., Li, L., Xue, L., Deng, S., & Liu, R. (2017). Molecular-cytogenetic study of de novo mosaic karyotype 45, X/46, X, i(Yq)/46, X, idic(Yq) in an azoospermic male: Case report and literature review. *Molecular Medicine Reports*, *16*(3), 3433–3438. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6981>
- Khatami, F., & Tavangar, S. M. (2018). A Review of Driver Genetic Alterations in Thyroid Cancers. *Iranian Journal of Pathology*, *13*(2), 125–135.
- Knaul, F. M., López Carrillo, L., Lazcano Ponce, E., Gómez Dantés, H., Romieu, I., & Torres, G. (2009). Breast cancer: a challenge for society and health systems. *Salud Publica de Mexico*, *51* Suppl 2, s138-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967267>
- Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, *13*(6), 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>
- Larripa, I. (2011). Citogenética humana : del microscopio al microscopio. *Hematología*, *15*(2), 27–34. Retrieved from <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol15.n2.27-34.pdf>
- Lee, Y., & Kim, Y. (2015). Cytologic , clinicopathologic , and molecular features of papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features : 10 case reports and systematic literature review, *8*(7), 7988–7997.
- Lim, H., Devesa, S. S., Sosa, J. A., Check, D., & Kitahara, C. M. (2017). Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *317*(13), 1338–1348. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2719>

- Llambí, S., & Núñez, R. (2007). Identificación de fragilidad cromosómica mediante 5 ' azacitidina en linfocitos de bovinos Identification of chromosome fragility using 5 ' azacytidine in cattle lymphocytes. *Facultad de Veterinaria, UDELAR, 39*, 63–66.
- Lopez, B. (1986). *Diagnostico prenatal en cultivo de células de liquido amniotico y biopsia de corion con la aplicación de tecnicas de bandeado cromosomico.*
- Lortet-Tieulent, J., Franceschi, S., Dal Maso, L., & Vaccarella, S. (2019). Thyroid cancer “epidemic” also occurs in low- and middle-income countries. *International Journal of Cancer, 144*(9), 2082–2087. <https://doi.org/10.1002/ijc.31884>
- Luo, J., Sun, X., Cormack, B. P., & Boeke, J. D. (2018). Karyotype engineering by chromosome fusion leads to reproductive isolation in yeast. *Nature, 560*(7718), 392–396. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0374-x>
- Malheiros, D. C., Canberk, S., Poller, D. N., & Schmitt, F. (2018). Thyroid FNAC: Causes of false-positive results. *Cytopathology, 29*(5), 407–417. <https://doi.org/10.1111/cyt.12575>
- Manso, García, S., & Velasco, Marcos, M. J. (2015). Valor actual de la ecografía en la caracterización de los nódulos tiroideos. Revisión de las últimas guías clínicas de actuación. *Radiología, Elsevier, 57*(3), 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2014.03.001>
- Marrero, M., Sinconegui, B., & Cruz, A. (2013). Marcadores moleculares en el cáncer de tiroides. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo, 50*(2), 84–98.
- Martín, M. (2016). Estructura y función de la glándula tiroides, 10. Retrieved from <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/14724-51704-1-PB.pdf>
- Martínez Díaz-Guerra, G., Serraclara Pla, A., Jódar Gimeno, E., & Hawkins Carranza, F. (2008). Thyroid pathology. Classification. Evaluation of the thyroid function. Antibodies. Antithyroids.

Thyroglobulin. Image in thyroids. Ultrasonography. Gammagraphy. TAC and PET. Fine-needle aspiration of the thyroid. *Medicine*, 10(14), 889–897. [https://doi.org/10.1016/s0211-3449\(08\)73176-x](https://doi.org/10.1016/s0211-3449(08)73176-x)

Marzo, M., & Vela, C. (2018). Overdiagnosis in cancer. *Atencion Primaria*, 50, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2018.08.002>

Mitchell, A. L., Gandhi, A., Scott-Coombes, D., & Perros, P. (2016). Management of thyroid cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *The Journal of Laryngology & Otology*, 130(S2), S150–S160. <https://doi.org/10.1017/s0022215116000578>

Montes, D., Montero, Y., Moreno-Rosi, A., & Gonzáles, H. (2011). Determinación de la genotoxicidad de la ivermectina a través del ensayo cometa. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 3(2), 322. <https://doi.org/10.24188/recia.v3.n2.2011.401>

Muñeton, M., & Ramírez, J. (2002). Citogenética de tumores sólidos, 15(2), 86–95.

Murillo, A. (2019). Estandarización del protocolo del ensayo del cometa neutro. *Universidad de Los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, Sta Fe de Bogota*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Navarro, D. (2012). Enfermedades del tiroides en Cuba. *Revista Cubana de Endocrinología*, 23(3), 198–202.

Novillo, M. (2010). Determinación cariotípica e ideograma en tinción estándar de Puma yagouarounds (É. Geoffroy Saint – Hilarie, 1803), 65–77.

Novoa Gómez, M. M., Vargas Gutiérrez, R. M., Obispo Castellanos, S. A., Pertuz Vergara, M., & Rivera Pradilla, Y. K. (2010). Evaluación de la calidad de vida y bienestar psicológico en pacientes postquirúrgicos con cáncer de tiroides. *International Journal of Psychology and*

Psychological Therapy, 10(2), 315–329.

O’Sullivan, B., Brierley, J., Byrd, D., Bosman, F., Kehoe, S., Kossary, C., ... Gospodarowicz, M. (2018).

Understanding and Reasonable Expectations, 18(7), 849–851.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30438-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30438-2).The

Palit, S. (2019). Nanomaterials for Industrial Wastewater Treatment and Water Purification. In

Handbook of Ecomaterials (pp. 195–235). Cham: Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6_9

Pan, X., & Wang, L. (2018). Comparison of diagnostic values between ultrasound elastography and

ultrasound-guided thyroid nodular puncture in thyroid nodules. *Oncology Letters*, 16(4),

5209–5213. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9257>

Peralta, N. (2012). *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. Tesis.

Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Pérez Machado, G. (2006). Polimorfismos Genéticos Y Cáncer De Tiroides. *Universitat Autònoma de*

Barcelona, 1(1), 268. Retrieved from [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2006/tdx-1123106-](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2006/tdx-1123106-093011/gpm1de1.pdf)

[093011/gpm1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2006/tdx-1123106-093011/gpm1de1.pdf)

Pineda, J., Galofré, J. C., Toni, M., & Anda, E. (2016). Hipotiroidismo. *Medicine (Spain)*, 12(13), 722–

730. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.06.002>

Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M. A., Björnsson, B. T., Einarsdottir, I. E., ...

Sweeney, G. E. (2001). Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative*

Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, 130(4), 447–459.

[https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00271-X)

- Prieto, E., & Janer, L. (1999). Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 18(1), 34–36.
- Pstr, N., Ziemnicka, K., Bluysen, H., & Weso, J. (2018). Thyroid cancers of follicular origin in a genomic light : in-depth overview of common and unique molecular marker candidates, 1–17.
- Pusztaszeri, M., & Bongiovanni, M. (2019). The impact of non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP) on the diagnosis of thyroid nodules. *Gland Surgery*, 8(Suppl 2), 86–97. <https://doi.org/10.21037/gs.2018.12.01>
- Ramírez, C. A., Guzmán, L., & Vidal, P. (2009). Artemisa en el manejo quirúrgico del nódulo tiroideo. *Cancer Causes and Control*, (1), 21–27.
- Ramos, E. (2015). Cirugía Radioguiada En Pacientes Con Recidiva Locorregionalde Cáncer Diferenciado De Tiroides.
- Razo, G. (2011). Efecto genoprotector del jugo de toronja mediante la reparación y apoptosis. *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación*.
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., & Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 35(2), 184–194.
- Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnostico Prenatal*, 23(2), 56–66.
<https://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>
- Rodríguez, J., Boffill, M., & Rodríguez, L. (2016). Risk factors for thyroid diseases: Ambato Social Security Hospital in Ecuador. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar Del Río*, 20(5), 628–638.

- Rodríguez, J. M., & Zerón, H. M. (2019). Genetics of Thyroid Disorders. *Folia Medica*, 61(2), 172–179. <https://doi.org/10.2478/folmed-2018-0078>
- Rojas, A., Yamarte, L., Urdaneta, K., Soto, M., Álvarez, F., Cañizalez, J., ... González, R. (2012). Utilidad del bandeado cromosómico con la enzima ALU I para la identificación de zonas metiladas en cáncer de mama . *Instituto de Investigaciones Genéticas, Facultad de Medicina, Universidad Del Zulia.*, 53(4), 331–341.
- Roman, B. (2017). The Thyroid Cancer Epidemic, 2017 Perspective, 25(5), 1032–1057. <https://doi.org/10.1111/mec.13536>.Application
- Romo, P., Díaz, R., & Laguardia, A. (1968). Acción de la fitoheaglutinina en la regeneración de la planaria (*Dugesia dorotocephala*). *Laboratorio de Genética Animal, Depto. de Biología Experimental Instituto de Biología, UNAM.*
- Ruiz, V., Boffill, M., González, O., & Blanco, F. (2005). Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 24(1), 5–13.
- Salazar-Vega, J., Ortiz-Prado, E., Solis-Pazmino, P., Gómez-Barreno, L., Simbaña-Rivera, K., Henríquez-Trujillo, A. R., ... Coral-Almeida, M. (2019). Thyroid Cancer in Ecuador, a 16 years population-based analysis (2001-2016). *BMC Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5485-8>
- Salazar, J., Ortiz, E., Solis, P., Gómez, L., Simbaña, K., Henríquez, A. R., ... Coral-almeida, M. (2019). Thyroid Cancer in Ecuador , a 16 years population-based analysis (2001 – 2016), 1–8.
- Scheijen, B., Meijers, R. W. J., Rijntjes, J., van der Klift, M. Y., Möbs, M., Steinhilber, J., ... Groenen, P. J. T. A. (2019). Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia*, 2227–

2240. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0508-7>

Schubert, I. (2007). Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(2), 109–115.

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.01.001>

Sierra, M., Soerjomataram, I., & Forman, D. (2016). Thyroid cancer burden in Central and South America. *Cancer Epidemiology*, 44, S150–S157.

<https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.07.017>

Soriano-Torres, M., & Arencibia, R. (2010). Estudio bibliométrico de la citogenética humana en el período 1999-2008, 21(4), 403–412.

Stevens, M., Simons, A., Rack, K., & Hastings, R. J. (2017). Cytogenetic nomenclature and reporting.

Methods in Molecular Biology, 1541, 303–309. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6703-2_24

Stölzel, F., Mohr, B., Kramer, M., Oelschlägel, U., Bochtler, T., Berdel, W. E., ... Ehninger, G. (2016).

Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, 6(1), 7–10. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.114>

Tamar, C., Constanza, N., & Fonseca, D. (2008). Utilidad de la citogenética en la medicina actual.

Visión histórica y aplicación. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.*, 33(4), 309–316.

Villaverde, F. (2000). La citogenética molecular en el año 2000. *Departamento de Genética de La Facultad de Ciencias de La Universidad de Navarra.*

Vishwakarma, R., & McManus, K. J. (2020). Chromosome instability; implications in cancer development, progression, and clinical outcomes. *Cancers*, 12(4), 1–19.

<https://doi.org/10.3390/cancers12040824>

- Wohlk G., N., Soto C., E., Bravo A., M., & Becker C., P. (2005). Polimorfismos G691S, L769L y S836S del proto-oncogen RET no se asocian a mayor riesgo de cáncer medular tiroideo esporádico en pacientes chilenos TT - G691S, L769L and S836S ret proto-oncogene polymorphisms are not associated with higher risk to sporadic. *Rev. Méd. Chile*, 133(4), 397–402. Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872005000400001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Zaharia, M. (2013). El cáncer como problema de salud pública en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 07–08. <https://doi.org/10.1590/s1726-46342013000100001>
- Zoeller, R. T., Dowling, A. L. S., Herzig, C. T. A., Iannacone, E. A., Gauger, K. J., & Bansal, R. (2002). Thyroid hormone, brain development, and the environment. *Environmental Health Perspectives*, 110(SUPPL. 3), 355–361. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s3355>
- Zúñiga Venegas, L. (2009). *Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis doctoral.*

Anexos