



# 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**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

**POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN GENES  
ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO Y SU RELACIÓN  
CON EL RIESGO DE PRESENTAR CÁNCER DE PIEL TIPO MELANOMA  
EN UN ESTUDIO CASO CONTROL DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA**

**AUTOR: ARAGÓN LOVATO FABIÁN ANDRÉS**

**DIRECTORA: PhD. JIMÉNEZ ARIAS ANA PATRICIA**

**SANGOLQUÍ, 2017.**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO Y SU RELACIÓN CON EL RIESGO DE PRESENTAR CÁNCER DE PIEL TIPO MELANOMA EN UN ESTUDIO CASO CONTROL DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA**" realizado por el señor **FABIÁN ANDRÉS ARAGÓN LOVATO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **FABIÁN ANDRÉS ARAGÓN LOVATO** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de marzo del 2017

Patricia Jiménez, PhD

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **FABIAN ANDRÉS ARAGÓN LOVATO**, con cédula de identidad N° 1717624868, declaro que este trabajo de titulación "**POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO Y SU RELACIÓN CON EL RIESGO DE PRESENTAR CÁNCER DE PIEL TIPO MELANOMA EN UN ESTUDIO CASO CONTROL DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 9 de marzo del 2017

FABIÁN ANDRÉS ARAGÓN LOVATO

C.C 1717624868



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **FABIÁN ANDRÉS ARAGÓN LOVATO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "**POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO Y SU RELACIÓN CON EL RIESGO DE PRESENTAR CÁNCER DE PIEL TIPO MELANOMA EN UN ESTUDIO CASO CONTROL DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA**" cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 09 de marzo del 2017

FABIÁN ANDRÉS ARAGÓN LOVATO

C.C 1717624868

## DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a mis tías/os, primas/os y amigos con quienes compartí gratos momentos y especialmente a mis padres Rebeca y Fabián y mi hermana Alejandra que siempre supieron brindarme el apoyo y sabiduría necesaria para superar los retos de la universidad.

**Fabián Andrés Aragón Lovato**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al personal del Centro de Investigación Genética y Genómica de la Universidad Tecnológica Equinoccial, especialmente a César Paz y Miño y Andrés López por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y ser una guía en el desarrollo de mi proyecto de titulación.

A Patricia Jiménez, PhD., investigadora de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, quien accedió a ser la evaluadora principal de mi proyecto de titulación. Su guía y colaboración fortalecen este trabajo.

Al personal docente y administrativo de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, quienes me formaron como profesional y quienes cultivaron en mí el orgullo y el placer de ser un científico.

**Fabián Andrés Aragón Lovato**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA .....	i
CERTIFICADO .....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.    Formulación del problema .....	1
1.2.    Justificación del problema.....	2
1.3.    Objetivos.....	4
1.3.1.    Objetivo General.....	4
1.3.2.    Objetivos Específicos .....	4
1.4.    Hipótesis.....	5
1.5.    Marco Teórico.....	5
1.5.1.    Cáncer de piel tipo melanoma: .....	5
1.5.1.2.    Epidemiología del melanoma .....	6
1.5.1.2.    Factores de riesgo.....	9
1.5.1.3.    Patogenia del melanoma.....	13
Fuente: (Restrepo & Velásquez, 2012) .....	16

1.5.1.4. Diagnóstico y clasificación del melanoma .....	17
1.5.1.4. Factores pronósticos y estadios tumorales del melanoma .....	19
1.5.2. Genes de metilación .....	22
1.5.3. Polimorfismos de nucleótido simple .....	25
<b>CAPÍTULO 2 : METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
2.1. Recolección de muestras patológicas y controles.....	27
2.2 Extracción de ADN .....	28
2.3 Cuantificación de ADN.....	28
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa .....	29
2.4.1 Diseño de cebadores para cada polimorfismo .....	29
2.4.2 Amplificación de polimorfismos .....	30
2.5 Electroforesis horizontal convencional.....	32
2.6 Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar .....	33
2.6.1. Purificación de producto de PCR mediante ampure.....	33
2.6.2 PCR de Secuenciación.....	34
2.6.3 Purificación de PCR de secuenciación mediante clean SEQ .....	36
2.6.4 Electroforesis capilar .....	37
2.7 Análisis estadístico .....	38
<b>CAPÍTULO 3 : RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 Extracción y evaluación de muestras de ADN .....	40
3.2 Amplificación de ADN mediante PCR .....	40
3.3 Identificación de genotipos mediante electroforesis capilar .....	43
3.4 Análisis estadístico .....	45
3.4.1 Historiales Clínicos.....	45
3.4.2 Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas.....	50
<b>CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios inclusión/exclusión para casos y controles del presente estudio. ....	27
Tabla 2. Parámetros generales de primers diseñados en el presente estudio. ....	29
Tabla 3. Mater mix estandarizada para cada polimorfismo en la reacción de PCR. ....	30
Tabla 4. Programa de PCR usado para el polimorfismo MTHFR C677T .....	31
Tabla 5. Programa de PCR usado para el polimorfismo MTHFR A1298C .....	31
Tabla 6. Programa de PCR usado para el polimorfismo MTR A2756G .....	31
Tabla 7. Programa de PCR usado para el polimorfismo MTRR A66G. ....	32
Tabla 8. Conformación de la master mix para la PCR se secuencia. ....	36
Tabla 9. Parametros utilizados para la PCR de secuencia. ....	36
Tabla 10. Distribución de edad y género en casos. ....	46
Tabla 11. Distribución de edad y género en controles. ....	47
Tabla 12. Asociación entre clasificación clínico histológica del melanoma y características patológicas de pacientes.....	49
Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo estudiado. ....	51
Tabla 14. Asociación entre cada polimorfismo y el riesgo de presentar melanoma. ....	52
Tabla 15. Asociación de cada genotipo con características histopatológicas de pacientes.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de riesgo fenotípicos de presentar melanoma frente al riesgo relativo estimado .....	11
Figura 2. Porcentaje del origen genético del melanoma .....	12
Figura 3. Proceso de patogénesis del melanoma .....	16
Figura 4. Clasificación de Clark.....	20
Figura 5. Clasificación TNM y criterios para clasificación en subgrupos .....	22
Figura 6. Enzimas importantes en el ciclo del ácido fólico .....	24
Figura 7. Esquema general de purificación con AMPure®.....	34
Figura 8. Incorporación de nucleótidos en el ADN .....	35
Figura 9. Electroferograma asignado un color a cada base nitrogenada. ....	38
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 278 pb del gen MTHFR (variante C677T).....	41
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 176 pb del gen MTHFR (variante A1298C). ....	41
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 344 pb del gen MTR (variante A2756G).....	42
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 205 pb del gen MTRR (variante A66G). ....	42
Figura 14. Electroferograma de variantes genotípicas del polimorfismo MTHFRC677T...	43
Figura 15. Electroferograma de variantes genotípicas del polimorfismo MTHFRA1298C. ....	44
Figura 16. Electroferograma de variantes genotípicas del polimorfismo MTRA2756G. ...	44
Figura 17. Electroferograma de variantes genotípicas del polimorfismo MTRRA66G. ....	45

## RESUMEN

El melanoma es una enfermedad que ha aumentado su incidencia a nivel mundial y en Ecuador no es la excepción. De todos los tipos de cáncer de piel, el melanoma es el más agresivo y actualmente no tiene un diagnóstico adecuado en las etapas tempranas de la enfermedad. Las enzimas metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), metionina sintasa (MTR) y metionina sintasa reductasa (MTRR), actúan en el metabolismo del folato y son esenciales para la metilación y síntesis de ácidos nucleicos. Los polimorfismos de nucleótido simple estudiados MTHFRC677T, MTHFRA1298G, MTRA2756G Y MTRRA66G reducen actividad enzimática causando alteraciones en la concentración de folato y homocisteína en plasma y por lo tanto generando problemas en la reparación, síntesis y metilación del material genético. Por esa razón es meritorio conocer la asociación entre la presencia de polimorfismos y el riesgo de presentar melanoma, en un estudio caso control en población Ecuatoriana. El ADN genómico se extrajo de 100 personas afectadas con melanoma y 305 personas sanas. Los genotipos de casos y controles se obtuvieron mediante secuenciación Sanger. Para las variantes polimórficas MTHFR677 (C/T; T/T y CT+T/T) se observó OR's de 1.72 (P=0.05); 6.48 (P=0.00) y 2.08 (P=0.01) respectivamente. Para las variantes MTHFR1298 (A/C; C/C; y A/C +C/C) se observaron OR's de 12.92 (P=0.00), 9.22 (P=0.01) y 11.68 (P=0.00) respectivamente. Para la variantes MTR2756 (A/G; A/G+G/G) se obtuvo OR's de 0.43 (P=0.02) y 0.48 (P=0.03) respectivamente y para las variantes MTRR66 (A/G; G/G; A/G+G/G) OR'S de 0.01 (P=0.00), 0.03 (P=0.00) y 0.02 (P=0.00) respectivamente. Concluyendo así que la presencia de las variantes polimórficas MTHFR677(C/T; T/T y CT+T/T) y MTHFR1298 (A/C; C/C; y A/C +C/C) son un factor de riesgo para la susceptibilidad de presentar melanoma en población Ecuatoriana.

### **Palabras clave:**

**MELANOMA**

**POBLACIÓN ECUATORIANA**

**GEN MTRR**

**GEN MTHFR**

**GEN MTR**

## ABSTRACT

Melanoma is a disease that has increased its incidence worldwide and in Ecuador is no exception. Of all skin cancers, melanoma is the most deadly and currently does not have an adequate diagnosis in the early stages of the disease. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) and MTR reductase (MTRR) enzymes act in the folate metabolism, which is essential in methylation and synthesis of nucleic acids. The single nucleotide polymorphisms, MTHFR C677T, A1298C, MTR A2756G, and MTRR A66G, reduced enzymatic activity that alter plasmatic folate and homocysteine concentrations, causing problems during the repairment, synthesis, and methylation of the genetic material. That is, why it is important to know if the single nucleotide polymorphisms are associated with the pathological characteristics and development of melanoma, through a case-control retrospective study. DNA was extracted from 305 healthy and 100 affected people. Genotypes were determined by Sanger genomic sequencing. We found significant association between all studied polymorphisms. To the variant MTHFR677 (C/T; T/T y CT+T/T) was observed an OR: 1.72 (P=0.05), 6.48 (P=0.00), 2.08 (P=0.01) respectively. To the variant MTHFR1298 (A/C; C/C; y A/C+C/C) was observed an OR: 12.92 (P=0.00), 9.22 (P=0.01) and 11.68 (P=0.00). The genotypes MTR2756 (A/G; A/G+G/G) with OR 0.43 (P=0.02) and 0.48 (P=0.03) and finally MTRR66 (A/G; G/G; A/G+G/G) with OR'S: 0.01 (P=0.00), 0.03 (P=0.00), 0.02 (P=0.00). Therefore, there is evidence that the polymorphisms studied MTHFR677(C/T; T/T y CT+T/T) and MTHFR1298 (A/C; C/C; y A/C+C/C) have significant effects on the susceptibility of melanoma in the Ecuadorian population.

### **Keywords:**

**MELANOMA**

**ECUADORIAN POPULATION**

**MTHFR GENE**

**MTR GENE**

**MTRR GENE**

## CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del problema

Según datos de la OMS (2015), la incidencia del cáncer de piel ha aumentado en todo el mundo y cada año existen dos millones de casos nuevos de esta patología, y en el Ecuador esas cifras no son aisladas (Cueva & Yépez, 2014).

Se puede clasificar a los cánceres de piel en no-melanomas (baso celular y escamo celular) y melanomas, los últimos resultan de gran interés en este estudio y es en donde va a estar enfocado el mismo, ya que el melanoma maligno es una de las neoplasias cutáneas más peligrosas y agresivas. Varias investigaciones reportan que se encuentra entre la quinta y décima causa de neoplasia en América y es la forma más común de neoplasia maligna fatal en los adultos jóvenes (Restrepo & Velásquez, 2012).

Según Bastidas (2013), la tendencia creciente de la incidencia del cáncer de piel y especialmente melanoma en el Ecuador está dada por la mejor capacidad de diagnóstico, aumento de expectativa de vida y mayor acceso a la información sobre la enfermedad, sin embargo un factor de riesgo determinante para esta enfermedad es la exposición a radiación UV cuyos niveles se ven influenciados con el deterioro de la capa de ozono disminuyendo la absorción de rayos UV en la tropósfera ,y por lo tanto aumentando la radiación sobre todo en latitudes medias y altas, así mismo los hábitos de cuidado de la piel se han ido perdiendo por cuestiones estéticas como el uso de camas solares y exposiciones prolongadas al sol (Lee, 1993).

Estados Unidos uno de los países más afectados por esta enfermedad ha aumentado su incidencia en 2.6% por año, para Ecuador ventajosamente el aumento de la incidencia ha sido leve, comparando los periodos 2001-2005 y 2006-2010 el aumento ha sido de 1 por cada 100000 habitantes en hombres y 0.1 por cada 100000 habitantes en mujeres (Cueva & Yépez, 2014).

En cuanto a la tasa de mortalidad del melanoma en Ecuador ha tenido un crecimiento leve, proporcional a la incidencia de esta patología. Sin embargo a pesar de que los casos de melanoma representan solo el 10% de todos los casos de cáncer de piel que se diagnostican en Quito, son responsables del 70 a 80% de las muertes por cáncer de piel, evidenciando la falta de un efectivo proceso terapéutico ante la enfermedad (Cueva & Yépez, 2014).

Según información de Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleo de Quito (2014), las ciudades con mayor incidencia de melanoma en el Ecuador se encuentran en la sierra debido a la situación geográfica de esta región donde la exposición a radiación ultravioleta es mayor. A pesar de que el promedio de edad para los pacientes diagnosticados con la enfermedad se encuentra entre 40 y 60 años (Espinoza & Poveda, 2003), existen reportes clínicos donde la enfermedad aparece en edades tempranas debido a casos congénitos.

## **1.2. Justificación del problema**

El melanoma es un tumor que ha crecido en frecuencia y para el cual todavía no existe un tratamiento efectivo a pesar de que la enfermedad ha sido bastante explorada (González, 2010), esto se debe a su difícil diagnóstico en etapas tempranas por la carencia de síntomas como dolor, que en periodos avanzados por el contrario se agudiza, hay que considerar que el daño por exposición al sol es acumulativo y puede existir latencia muy larga desde la iniciación a la exposición al sol y el momento del desarrollo clínico con lesiones evidentes. Por dichas razones esta investigación constituye de gran interés para la comunidad, especialmente individuos susceptibles a la patogenia.

Existen un sin número de estudios sobre el melanoma a nivel genético y según González (2010) continuamente se describen nuevos genes implicados directa o indirectamente en la génesis y desarrollo del melanoma. Botella (2010), describe que las mutaciones de diferentes genes influyen en el tipo y zona del cuerpo en donde se desarrolla el melanoma.

Del total de los casos de melanoma el 12% son hereditarios es decir melanoma familiar y aproximadamente el 90% de casos son esporádicos (Puig, Aguilera, & Badenas, 2006), este 12% de personas afectadas nos indica que existen genes defectuosos que se transmiten de generación en generación y que los individuos portadores de estos alelos defectuosos tendrán susceptibilidad a padecer cáncer, por lo tanto la identificación de estos genes es meritoria para diagnosticar la enfermedad en estados iniciales (Avilés & Lázaro, 2006).

De las mutaciones hereditarias se ha visto que el 40% son inducidas por mutaciones en el gen CDKN2A, el 1% de los casos inducidos por otros genes estudiados como CDK4, p14ARF, entre otros, sin embargo aún queda un porcentaje alto (aproximadamente 50%) de genes por estudiar como MTHFR, MTR y MTRR los cuales están involucrados en el metabolismo del folato necesario para la síntesis y reparación del ADN, y no se ha explotado sus conocimientos sobre todo en la zona de América Latina (Eggermont, Spatz, & Robert, 2014).

Existen investigaciones previas que indican que la presencia de polimorfismos en genes implicados en el metabolismo del folato como MTHFR, tienen efectos sobre la susceptibilidad de presentar diferentes tipos de cáncer como cáncer de colon (Osian, Procopciuc, & Vlad, 2007) de próstata (Lopez-Cortes *et al.*, 2013) cáncer de mama (Lopez-Cortes *et al.*, 2015) y el más relacionado con el estudio, carcinoma baso celular (Lesiak *et al.*, 2011) además la falta de estudios previos a nivel genético sobre cáncer de piel en pacientes ecuatorianos, revela la importancia de este estudio.

De existir una relación significativa entre la frecuencia de polimorfismos en los genes a estudiarse con la incidencia de melanoma, se podrá caracterizar de mejor manera la enfermedad determinando un pronóstico efectivo y generando nuevos tratamientos terapéuticos adaptados a cada paciente.

El éxito para detener la enfermedad es el diagnóstico temprano y métodos actuales no colaboran en algunos aspectos, por eso se busca clasificar y caracterizar la enfermedad a nivel molecular. Aunque el melanoma

diagnosticado en estadios temprano puede ser tratado mediante escisión quirúrgica, los pronósticos de melanomas avanzados son lamentables. Cuando el melanoma ha hecho metástasis tiene poca respuesta a quimioterapias, terapias inmunológicas o radioterapia. Sin embargo recientes descubrimientos en genética del melanoma han permitido desarrollar pequeñas moléculas dirigidas a mutaciones de genes profundamente estudiados como BRAF. Que han presentado resultados prometedores en estudios preclínicos y en ensayos en fase clínica temprana (Botella & Sanmartín, 2010; Kong, Kumar, & Xu, 2010; Liu & Sheikh, 2014).

La investigación debe enfocarse en identificar marcadores biológicos específicos del melanoma que ayuden a predecir el curso de la enfermedad. Con tan solo el análisis de la sangre que permita saber si el paciente es propenso a padecer la enfermedad o tener una remisión de esta.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Asociar las frecuencias de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP) en genes involucrados en el metabolismo del ácido fólico, con el riesgo de presentar cáncer de piel tipo melanoma en un estudio caso control de la población ecuatoriana.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Extraer ADN genómico de 100 muestras de melanoma fijadas en parafina obtenidas del Hospital Carlos Andrade Marín y SOLCA – Quito y extraer ADN genómico del grupo control.
- Detectar la presencia de los polimorfismos MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G y MTRR A66G, en el ADN de las muestras de melanoma y muestras control mediante el uso de la técnica de SANGER.



- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de nucleótido simple de las muestras de melanoma y muestras control.
- Determinar el riesgo de adquirir melanoma bajo la presencia de los polimorfismos estudiados a través de un análisis estadístico ODDS RATIO.

#### **1.4. Hipótesis**

Existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de los polimorfismos MTHFRC677T, MTHFRA1298C, MTRA2756G y MTRR A66G y el riesgo a desarrollar cáncer de piel tipo melanoma en población ecuatoriana.

#### **1.5. Marco Teórico**

##### **1.5.1. Cáncer de piel tipo melanoma:**

El melanoma maligno es una de las enfermedades cutáneas más graves y llama mucho la atención por su creciente incidencia y el pronóstico pobre en el caso de algunos tumores (Acosta, Fierro, Velásquez, & Rueda, 2009).

Generalmente el melanoma se presenta en la piel pero también pueden aparecer en zonas mucosas como, superficies pigmentadas del ojo. En las mujeres se presenta con mayor frecuencia en extremidades inferiores y en hombres en el tronco, la cabeza o el cuello (National cancer institute, 2016).

Las tasas de incidencia del melanoma han quintuplicado sus valores las últimas tres décadas sobre todo en la población blanca (Leiter, Eigentler, & Garbe, 2014).

El Melanoma es el tipo de cáncer de piel relativamente frecuente y es la principal causa de muerte por enfermedades cutáneas, si no se detecta en sus etapas primarias (kumar, Abbas, Fausto, & Aster, 2010). El melanoma constituye solo el 4% de diagnósticos de todos los tipos de cáncer de piel, sin embargo es responsable de 70 a 80% de las muertes de esta enfermedad por lo que se debe levantar sospechas de la enfermedad en su fase inicial (Restrepo & Velásquez, 2012).

Esta patogenia se desencadena por la acumulación de varias mutaciones en el genoma del melanocito, lo que genera una alteración en el ciclo celular y una proliferación descontrolada (Restrepo & Velásquez, 2012).

El melanoma maligno se origina en los melanocitos a partir de un nevo precursor que puede ser un nevo displásico, nevo atípico o nevo de Clark, estos se encuentran en el estrato basal de la epidermis desde donde las células tumorales invaden los estratos suprabasales de la epidermis y la dermis e hipodermis, estas células neoplásicas pueden evolucionar en fases que incluyen hiperplasia atípica, displasia y melanoma in situ (Botella & Sanmartín, 2010).

Ya que los melanocitos neoplásicos tienen la capacidad de producir melanina, el melanoma se puede identificar ultra-estructuralmente por la presencia de melanosomas y macroscópicamente por la presencia de coloración gris o negruzca del tumor primario. Cuando el melanoma hace metástasis en tejido sanguíneo suele diseminarse ampliamente incluso a sitios en los cuales las metástasis son raras como el intestino delgado o el miocardio (Espinoza & Poveda, 2003).

#### **1.5.1.2. Epidemiología del melanoma**

De todos los tipos de cáncer de piel el melanoma es el más agresivo y peligroso, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud WHO (2016). aproximadamente se diagnostican 160000 casos cada año en todo el mundo (79000 hombres y 81000 mujeres) y representa el 1.5 % de neoplasias para ambos sexos (OMS, 2016).

Considerando la edad y género en la que varía esta enfermedad, en personas de menos de 45 años los índices son más altos en mujeres, a partir de los 60 años los índices de hombres superan en el doble a los de las mujeres y a partir de 80 años de edad los hombres tienen una probabilidad casi tres veces mayor de presentar melanoma. El índice Máximo se da entre 40 y 60 años (National cancer institute, 2016).

Esta neoplasia ha experimentado un crecimiento muy notable triplicando su incidencia en todo el mundo en los últimos 40 años (Espinoza & Poveda, 2003). Se estima que en Occidente su incidencia aumenta a un ritmo de 4% por año. Comparándolo con otros tipos de cáncer el melanoma presenta una alta relevancia (Acosta *et al.*, 2009). En Estados Unidos por ejemplo ocupa el quinto lugar entre los tipos más comunes de cáncer en hombres y el séptimo lugar en mujeres. En otros países como Australia y Nueva Zelanda es el cuarto cáncer más común, en Gran Bretaña y Bélgica el décimo octavo y en España el tercero más común después del cáncer de hígado y tiroides (Avilés, Lázaro, & Lecona, 2006; Oliveros, Bravo, Zambrano, Cepeda, & Ramirez, 2012).

Un Estudio realizado en Estados Unidos en 2014 reporto diferentes tasas de riesgo de acuerdo a cada etnia. El riesgo de padecer esta enfermedad fue de 1 en 44 para personas con piel clara, 1 en 250 para personas Hispanas (no blancas), 1 en 350 para nativos americanos, 1 en 800 para Asiáticos y 1 en 1100 para afroamericanos, demostrando que la piel clara es más susceptible a esta enfermedad. A nivel mundial la población caucásica tiene el mayor riesgo de desarrollar melanoma y la población asiática el menor riesgo (National cancer institute, 2016).

Según datos recopilados por (Erdmann *et al.*, 2013) el aumento de las tasas de incidencia anual de esta neoplásica se ha observado en las últimas 6 décadas, principalmente en población blanca. Como se muestra en el anexo1 ,datos obtenidos en periodos de aproximadamente 20 años los países que mayor incidencia presentan son Australia (39,3) y Nueva Zelanda (35,1) ubicados en Oceanía, en Europa los países con mayor incidencia son Suiza (14,6), Noruega (14,4) y Dinamarca (12,5) en América los países que mayor

incidencia presentan son Estados Unidos (15.5) y Canadá (11), llama la atención que los datos disponibles de Asia la mayor incidencia tiene Israel con 11.3 el resto de países no sobrepasa la unidad en valores de incidencia, confirmando que es la región con menor incidencia del planeta (Erdmann *et al.*, 2013). En cuanto a países más cercanos en la región como Colombia, registros del 2007 indican que la incidencia se encuentra en 3,5 por 1000.000 habitantes en hombres y 3,1 por 1000. 000 habitantes en mujeres (Oliveros *et al.*, 2012).

Considerando el género en datos de incidencia del melanoma en hombres a nivel mundial Estados Unidos ocupa el primer lugar, Australia segundo y Nueva Zelanda tercero. Ecuador ocupa el puesto 37° a nivel mundial detrás de otros países de la región como Brasil (24°), Uruguay (31°), Colombia (34°) y Argentina (36°). Para mujeres en cambio Australia ocupa el primer lugar, Estados Unidos el segundo y Nueva Zelanda el tercero, Ecuador está en el puesto (36°) después de Brasil (32°) y Argentina (33°) (Cueva & Yépez, 2014).

Como se ha visto las tasas de incidencia y mortalidad del melanoma varían de un país a otro y más con los diferentes grupos étnicos específicos de cada región. La mayor incidencia se registra en países con fuerte irradiación solar y con población blanca no autóctona como Australia, Nueva Zelanda, USA y Sudáfrica. En Europa es más frecuente en el norte y oeste donde hay población muy blanca y que tiende a exponerse al sol en verano (Restrepo & Velásquez, 2012).

En Ecuador los periodos comprendidos entre los años 2006 y 2010 las tasas de incidencia para hombres fueron de 3.7 por 1000.000 habitantes, mientras que para mujeres fueron de 3.5. (Cueva & Yépez, 2014).

Tomado en cuenta reportes de años 2001-2005 y comparándolos con los años 2006-2010 la incidencia ha aumentado en orden de 0,9 por cada 100.000 habitantes en hombres y 0.1 por cada 100.000 habitantes en mujeres, el leve incremento de incidencia ha sido más marcado en hombres que en mujeres (Cueva & Yépez, 2014).

La tasa de mortalidad para los periodos comprendidos entre 2006 y 2010 registra valores de 1,6 por 1000.000 habitantes para hombres y 1,3 por cada 1000.000 habitantes para mujeres.

Comparado con años anteriores se observa un aumento leve que tiene relación directa con el ligero aumento de la tasa de incidencia. Contrastando estos valores con datos de otros países, los registros de incidencia y mortalidad son muy inferiores, planteando la hipótesis que la constitución étnica de nuestros habitantes podría ser la clave para explicar el poco aumento de incidencia a diferencia de países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos que como se ha indicado anteriormente tienen mayor riesgo de padecer esta enfermedad (Cueva & Yépez, 2014; Espinoza & Poveda, 2003).

#### **1.5.1.2. Factores de riesgo**

Los factores de riesgo para el melanoma son circunstancias que aumentan las probabilidades de padecer esta enfermedad e identificarlos es fundamental para optimizar la prevención primaria y el reconocimiento precoz. Se pueden dividir en factores propios del individuo (fenotípicos), factores genéticos y factores ambientales (Acosta *et al.*, 2009).

Existen varios factores propios del individuo entre los más importantes es la presencia de melanoma previo, aunque este se haya extraído por métodos quirúrgicos el riesgo permanece latente, alrededor de un 5% de las personas con melanoma padecerán un segundo melanoma en algún momento de sus vidas. Las personas que han tenido otro tipo de cáncer de piel también presentan riesgo de padecer melanoma (American Cancer Society, 2016).

El riesgo de recurrencia aumenta considerablemente si se suma una historia familiar positiva, alrededor del 10% de todas las personas con melanoma tienen familiares de primer grado (padres, hermanos, hijos) que han presentado melanoma (Acosta *et al.*, 2009).

La presencia de nevus o mejor conocido como lunares también influye en la presencia del melanoma, hay que considerar el tipo de nevo presente en el individuo, los nevus normales o benignos no causan ningún problema aunque una persona que tiene muchos lunares es más propensa a padecer melanoma (American Cancer Society, 2016).

Los nevus displásicos o lunares atípicos son comúnmente más grandes que los normales y presentan forma o color anormal, con frecuencia los nevus displásicos son hereditarios y un número pequeño de estos tipos de lunares puede convertirse en cáncer, sin embargo los individuos con mayor número de nevus atípicos tiene mayor riesgo de desarrollar melanoma aunque no necesariamente sobre uno de estos lunares atípicos. Cuando se hereda una cantidad alta de nevus displásicos se denomina síndrome de nevus displásicos y las personas afectadas tienen un riesgo muy alto de presentar melanoma (Acosta *et al.*, 2009).

El riesgo de tener melanomas aumenta alrededor de 1-10% cuando se tienen lunares que están presentes al nacer, es decir nevus melanocíticos congénitos, y también influye mucho su tamaño por lo que las personas con nevus congénitos más grandes tendrán más probabilidades de presentar melanoma. Así por ejemplo el 5% de nevus congénitos gigantes pueden tener una transformación maligna (Restrepo & Velásquez, 2012).

La presencia de diferentes enfermedades pueden estimular la presencia de melanoma, las más relacionadas con la enfermedad son: enfermedad metastásica, la melanosis neurocutánea, y xeroderma pigmentado. Personas inmuno deprimidas, como niños con inmunodeficiencias genéticas, enfermedades malignas previas o personas con VIH han reportado un incremento en el riesgo de presentar melanoma (Eggermont *et al.*, 2014).

Como se ha mencionado anteriormente el riesgo de sufrir melanoma es mayor en poblaciones caucásicas ya que la piel blanca al tener menor proporción de melanina, se quema o se llena de pecas con facilidad aumentando el riesgo considerablemente, de igual manera si presentan cabello rubio o pelirrojo o tienen ojos claros como azules o verdes.

En la figura 1. se resumen los riesgos propios de un individuo mencionados anteriormente con su respectivo riesgo relativo estimado, que su valor indica cuánto más veces tiende a desarrollar un evento, en este caso padecer melanoma (Acosta *et al.*, 2009).

Factor de riesgo	Riesgo relativo estimado	
Xeroderma pigmentoso	1.000	
Nevus displásicos más melanoma previo más historia familiar	500	
Nevus displásicos, sin melanoma previo más historia familiar	148	
Historia familiar positiva (más de 3 parientes afectados)	35-70	
Nevus displásicos	11-27	
Múltiples nevus benignos (más de 100)	11	
Nevus melanocíticos congénitos (grandes)	17 -21	
Historia personal de melanoma	8,5 -9	
Inmunosupresión	Trasplantes	3
	VIH	1,5
Fototipo 1 de piel	1,7	
Ojos azules	1,6	
Pelirrojos	2,4	
Historia de quemaduras intensas	2,5	

**Figura 1. Factores de riesgo fenotípicos de presentar melanoma frente al riesgo relativo estimado**

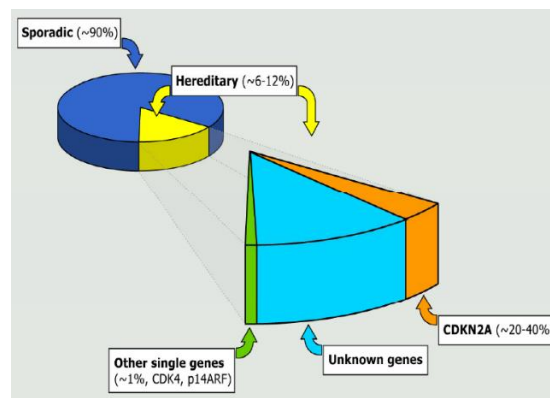
**Fuente:(Acosta *et al.*, 2009).**

En cuanto a factores ambientales la radiación ultravioleta ya sea de fuentes naturales como el sol o artificiales como lámparas solares y cámaras bronceadoras es el factor principal, pero su relación es más compleja de lo que parece (Avilés & Lázaro, 2006). Los rayos UV dañan el ADN de los melanocitos alterando los genes que controlan el crecimiento de las células de la piel (American Cancer Society, 2016).

La frecuencia de exposición a los rayos UV y la localización anatómica son variables importantes en la presencia del melanoma. La exposición solar intermitente es decir la que se recibe en la niñez y adolescencia, se relacionan

con melanoma de tronco (pecho y espalda), la exposición crónica se relaciona con melanoma de rostro cuello o brazos. La frecuencia también puede relacionarse con el tipo de melanoma, la presencia de melanoma de extensión superficial se asocia con exposición intermitente y el melanoma lentigo maligno con exposición crónica, así mismo lugares del cuerpo que tienen poca exposición a la luz o casi nula como zonas mucosas (como boca) están relacionadas a otros tipos de melanoma como nodular o lentigo acral. (Orazio, Jarrett, Amaro-Ortiz, & Scott, 2013).

Los factores genéticos involucran todos los genes que se ven alterados y den paso al desarrollo del melanoma, estos genes pueden estar alterados ya sea por factores ambientales o por factores hereditarios. Los genes que se ven más afectados por factores ambientales como la luz se relacionan a melanoma esporádico, y los genes que tienen factores hereditarios se relacionan a melanoma familiar. Como se observa en la figura 2 se calcula que entre el 6% y el 12% de los melanomas se originan por factores hereditarios y el riesgo es mayor según el número de familiares afectados y puede llegar al 100% de riesgo si hay 5 o más familiares directos con melanoma. Los genes más estudiados para el melanoma familiar son el  $CDKN2A$  y el  $CDK4$  y para el melanoma esporádico genes de la vía del MAPK como  $BRAF$  y  $NRAS$ , en el siguiente apartado se explica con mayor detalle el desarrollo del melanoma a nivel genético (Huang *et al.*, 2013).



**Figura 2. Porcentaje del origen genético del melanoma**

Fuente: (Puig *et al.*, 2006).



### 1.5.1.3. Patogenia del melanoma

El melanoma es uno de los tipos de cáncer que crece con mayor rapidez en todo el mundo (Liu & Sheikh, 2014). El melanoma cutáneo es una neoplasia maligna producida en los melanocitos, estas células se encuentran en la capa basal de la epidermis, tienen la función de producir melanina y son responsables del color de la piel (Liu & Sheikh, 2014).

Para que un melanocito se transforme en melanoma debe seguir una serie de procesos que acumula alteraciones genéticas, además se dan complejas interacciones de factores genéticos, inmunológicos y ambientales. Si bien no es una regla para todos los casos, los estadios progresivos inician con el desarrollo de un nevus melanocito, pasando por el nevus displásico hasta llegar al melanoma in situ, posteriormente empieza la fase de crecimiento radial y vertical del melanoma. Este es el punto crítico donde unos melanomas hacen metástasis mientras otros ralentizan su crecimiento (Liu & Sheikh, 2014).

El melanoma puede expresar múltiples moléculas que le dan la capacidad de crecimiento local y crecimiento a distancia, induciendo alteraciones vasculares, en la matriz extracelular y a la vez generando mecanismo de las células tumorales para evadir al control inmunológico (Restrepo & Velásquez, 2012).

Se conoce que la respuesta mediada por los linfocitos T es la principal implicada para la destrucción de tumores melanocíticos, otros anticuerpos anticélulas pueden tener un papel importante para regular la diseminación (Mukherji, 2013).

Como otros tipos de cáncer, desde el punto de vista genético el melanoma es la consecuencia de la acumulación de múltiples mutaciones en el genoma del melanocito, que llevan que sufra alteración del ciclo celular y proliferación desmedida, evasión de la respuesta inmunitaria e invasión del tumor y metástasis (Restrepo & Velásquez, 2012). El 90% de casos de melanoma son casos esporádicos y del 6-12% son casos de melanoma familiar, es decir se ve influenciado por factores hereditarios. Se puede

considerar que el melanoma familiar tiene mayor influencia genética sin embargo en el melanoma esporádico también se encuentran genes implicados en el desarrollo del melanoma (Acosta *et al.*, 2009).

Los principales genes asociados en el melanoma familiar son CDKN<sub>2A</sub> y el CDK<sub>4</sub> que están involucrados en el control del ciclo celular. De 20% a 50% de casos familiares de melanoma se encuentran en mutaciones en CDKN<sub>2A</sub>, este gen es considerado de baja prevalencia pero alta penetrancia, quiere decir que afecta a pocos individuos pero se confiere al individuo que posea la mutación un alto riesgo de presentar melanoma. El CDKN<sub>2A</sub> codifica dos proteínas supresoras tumorales P16 y P14. La mutación en P14 disminuye los niveles de P53 reduciendo la muerte celular y la apoptosis. Cuando la actividad P16 esta disminuida la proteína del retinoblastoma se fosforila y se libera al factor transcripciones E2F, el cual induce el paso G1 a S activando el ciclo celular desmedidamente (González, 2010; Horn *et al.*, 2013).

Otro gen asociado al melanoma familiar es el MCR1, tiene alta prevalencia pero baja penetrancia. Este gen codifica para el receptor transmembrana de la MSH. Ya que es un gen altamente polimórfico, puede tener variantes que determinen una menor afinidad del receptor por la MSH disminuyendo la síntesis de AMPc la cual ejerce efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y antioxidantes (Pasquali *et al.*, 2015).

Como se mencionó antes aproximadamente 90% de los caso de melanoma son esporádicos y hay varias alteraciones de vías o rutas metabólica que inducen al desarrollo de melanoma, las principales vías son la vía MAP kinasas y la vía PI3/AKT (Kong *et al.*, 2010).

La vía MAPK es una cascada de señales de transducción que incluye los genes NRAS, BRAF, MEK y ERK. La vía MAPK interviene en la proliferación, la sobrevivida y la invasión celular y esta constitutivamente activada en el melanoma, las mutaciones de los diferentes genes de esta vía varían según el tipo de melanoma. El gen más estudiado en esta vía es BRAF (Isoforma del gen RAF) activador de MEK, y es el oncogén más frecuente mutado en melanoma (~80%). Las características, funciones y cambios en el melanoma de este gen se muestran en el anexo 2 (Kong *et al.*, 2010).

En la cascada PI3/AKT actúan los genes TKR y el RAS activando PI3 que a su vez activa por fosforilación a su efector el gen AKT. El grupo de genes AKT (1, 2, y 3) codifican a las proteinquinasas B y promueven la proliferación y sobrevivencia celular, así como la capacidad de generar metástasis. Este proceso es regulado por los genes PTEN y RAS. Otros genes estudiados que interfieren en la patogenia del melanoma son TP53, genes de la súper familia Bcl-2, gen MITH, gen c-KIT, y otros cuya información e influencia sobre el melanoma se describen en el anexo 2 (Restrepo & Velásquez, 2012; Shitara *et al.*, 2015).

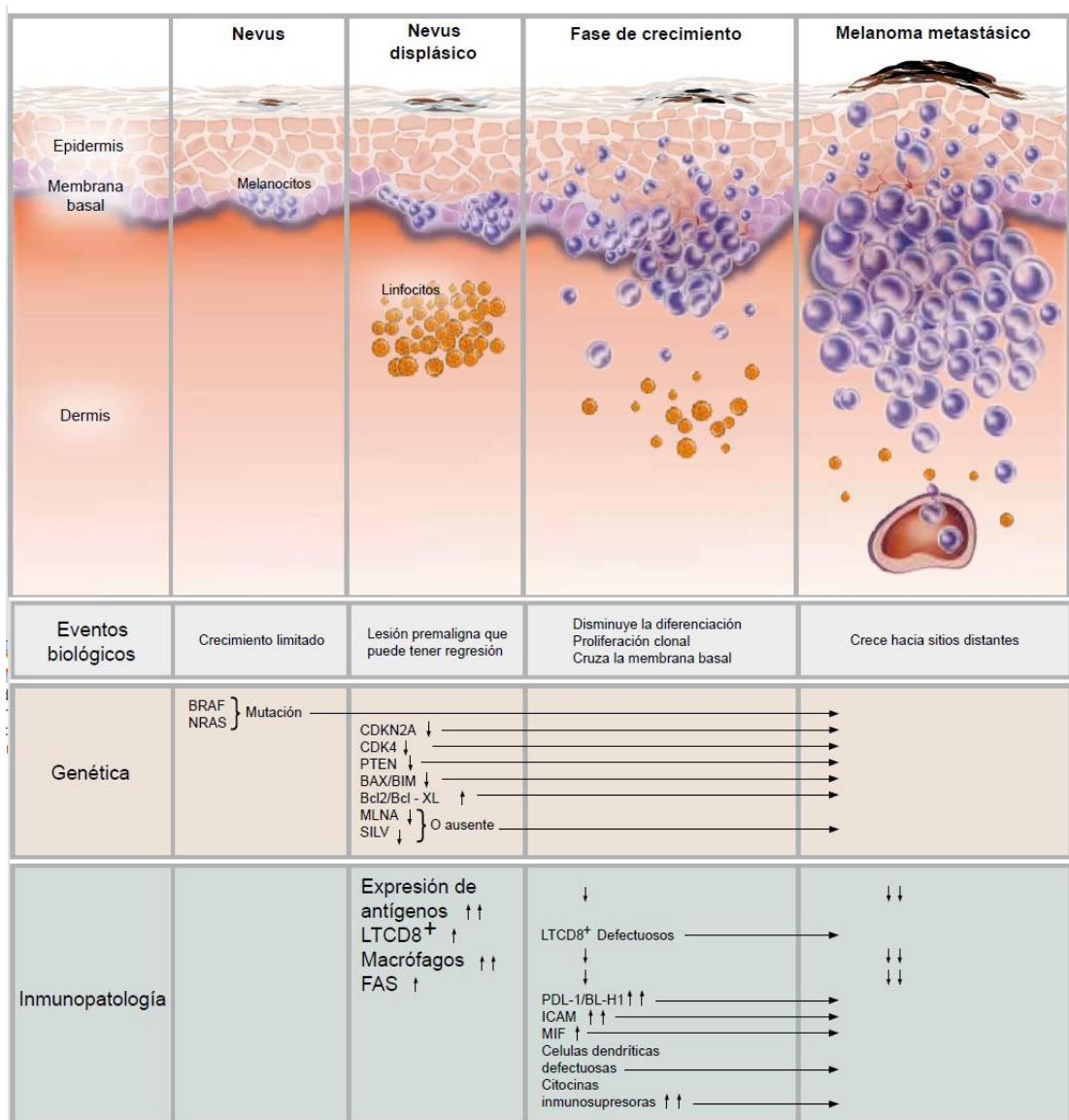
En la figura 3 se puede ver de manera resumida como factores genéticos, inmunopatológicos y biológicos interactúan entre sí para el desarrollo del melanoma.

Tenemos que las mutaciones en BRAF y NRAS están implicadas en el desarrollo y progresión del melanoma en partes iniciales, la pérdida o disminución de los genes CDKN2A, CDK4, y PTEN produce activación de la proliferación celular sin control en nevos displásicos. Bax/Bim moléculas proapoptóticas, que están disminuidas en el melanoma desde etapas iniciales. Bcl2/Bcl2-XL moléculas antiapoptóticas aumentadas desde estadios tempranos. SILV y MLANA, genes cuya expresión está disminuida o ausente en la progresión de nevos a melanoma.

La expresión de Antígenos, esta aumentada en etapas iniciales, pero con la progresión esta expresión disminuye permitiendo evadir la respuesta inmune. LTCD8+, en melanomas ya establecidos son incapaces de liberar perforinas y otras enzimas citotóxicas.

Los Macrófagos, están en mayor cantidad en melanomas no metastásicos. La expresión de FAS y PDL1/B7-H1, va disminuyendo según la progresión del melanoma para poder escapar de la apoptosis. ICAM-1, moléculas de adhesión que tiene mayor expresión en células tumorales que en nevos, se correlaciona directamente con el estadio tumoral. MIF, mayormente expresada en células tumorales, inhibiendo la migración de macrófagos y estimulando el crecimiento y la invasión.

Células dendríticas, son defectuosas al no expresar adecuadamente moléculas coestimuladoras, produciendo una regulación inadecuada. Citosinas inmunosupresoras, están aumentadas para promover un ambiente inmunosupresor (Restrepo & Velásquez, 2012).



**Figura 3. Proceso de patogénesis del melanoma**

**Fuente: (Restrepo & Velásquez, 2012)**

#### **1.5.1.4. Diagnóstico y clasificación del melanoma**

El diagnóstico clínico del melanoma se basa en la regla ABCDE que indica A: asimetría, B: Bordes irregulares, C: variación de color, D: diámetro >6mm, E: elevadas superficies. La herramienta más adecuada y utilizada actualmente para el diagnóstico es el microscopio de superficie cutánea o dermatoscopio el cual permite una mejor visualización de la lesión. La imagen captada puede ser analizada por sistemas digitales avanzados como el MEDS (sistema automatizado de diagnóstico del melanoma) el cual integra múltiples algoritmos de clasificación y los utiliza para analizar diferentes medidas y características de la lesión del paciente para producir diagnósticos más efectivos (Liu & Sheikh, 2014)

El principal diagnóstico del melanoma se ha basado en identificar su aspecto histológico y revisar la expresión de ciertos marcadores inmunohistoquímicos como proteína S100 o Melan/MART1 que son confirmatorios del diagnóstico sin embargo muchos de estos factores no revelan el estado real del tumor y pronóstico de la enfermedad (Botella & Sanmartín, 2010).

Como lo menciona Botella (2010), existe un grupo de melanomas que a pesar de ser localmente invasivos, crecen muy lentamente y no suelen comprometer la vida del paciente sin embargo en muchas ocasiones el diagnóstico es tardío y la enfermedad se encuentra en estados avanzados de metástasis que no se pueden caracterizar con los métodos tradicionales. Por lo que se opta por buscar marcadores moleculares que además de identificar la presencia de melanoma, discrimine su potencial agresivo. Para identificar un tratamiento adecuado para melanomas invasivos tras cirugías extensas o tratamientos más leves para melanomas con buen pronóstico (Botella & Sanmartín, 2010; Liu & Sheikh, 2014).

En los años iniciales de sus estudios el melanoma fue considerada como una enfermedad homogénea con mal pronóstico, con el desarrollo de la medicina y de investigaciones en lesiones pigmentadas se ha establecido

subtipos de melanoma con características clínico patológicas bien diferenciadas (Nagore *et al.*, 2009).

De estos tipos el melanoma de extensión superficial es el más común con acerca de 70% de los casos, seguido del melanoma nodular con 15-30% de casos y el melanoma lentigo maligno y acral con menos del 10% de los casos (Dummer, Hauschild, Lindenblatt, Pentheroudakis, & Keilholz, 2015).

El Melanoma de extensión superficial es el más común y se presenta como una placa asimétrica e irregular en forma y color, pigmentada con tonos de color negro, café, azul oscuro y rosa, es más común en personas de tez blanca. Crece lentamente en el transcurso de los años y pierde su pigmentación en la fase de crecimiento vertical ya que las células neoplásicas pierden su habilidad de producir melanina. Es más frecuente en personas de 30 a 50 años y se asocia con exposición intermitente a radiación uv (Erdmann *et al.*, 2013).

El melanoma nodular se origina de células madre que se encuentran en la dermis y luce como un área elevada de color azul-negrusco oscuro o rojo-azulado, en algunos casos carece de pigmentación. Es más frecuente en hombres y generalmente se encuentra con más reiteración en cuello, cabeza y tronco, tiene un pobre pronóstico ya que frecuentemente al diagnosticar tiene un índice de Breslow profundo (Dummer *et al.*, 2015; Duncan, 2009).

El melanoma lentigo maligno se origina de células madre localizadas en los folículos pilosos y aparece en personas de edad avanzada, es más común en la piel dañada por exposición crónica al sol, en la cara, el cuello y los brazos. Las zonas de piel comprometida son grandes, planas y de color marrón con áreas de color café. El lentigo maligno se encuentra limitado en la epidermis y no sobrepasa la membrana basal por lo cual solo presenta crecimiento radial que puede llegar a durar 20 años, si este empieza la fase de crecimiento vertical se considera lentigo maligno melanoma que aunque no es muy común puede convertirse en microinvasor (Duncan, 2009; Erdmann *et al.*, 2013).

El melanoma lentiginoso acral es la forma menos común de melanoma. Generalmente ocurre en las palmas de las manos, las plantas de los pies o por debajo de las uñas y es más común en las personas de raza negra (Espinoza, 2003).

#### **1.5.1.4. Factores pronósticos y estadios tumorales del melanoma**

Los factores pronósticos predicen el curso del melanoma ayudan a establecer la expectativa de vida de los pacientes que sufren esta enfermedad. El pronóstico del melanoma depende principalmente de que haya o no metástasis, cuando existe metástasis en ganglios linfáticos cercanos o metástasis distantes los pronósticos son pobres de tal forma que menos del 10% de pacientes sobrevive más de 5 años con la neoplasia (Balch *et al.*, 2009; Josep, Martí, & Manuel, 2005).

Si no existe metástasis a distancia el pronóstico depende del número de ganglios metastásicos afectados por el tumor y si esta no se da se revisa la profundidad que ha alcanzado el tumor dentro de las capas internas de la piel (Factor de Breslow). Mientras mayor sea el grosor, mayor será el riesgo de metástasis linfáticas o a distancia. Otros factores que acompañan a la profundidad o grosos son la clasificación Clark del tumor, ulceración histológica, edad y género de los pacientes, índice mitótico, respuesta inflamatoria inmunitaria, patrones de crecimiento del melanoma, invasión vascular y localización anatómica del tumor (Josep *et al.*, 2005).

El grosor de Breslow es la medida en milímetros de la profundidad del tumor que predice con bastante precisión la progresión de las lesiones del melanoma cuando estas son mayores a 1mm, de tal manera mientras más grueso sea el tumor peor será el pronóstico. Los intervalos de la clasificación Breslow son 4 ( $\leq 1$ mm, 1.01-2mm, 2.01-4mm y  $>4$ mm). Otro parámetro para medir la profundidad del tumor es la clasificación Clark que se muestra en la figura 4 , aunque los sistemas Breslow y Clark se relacionan en un 80 % el más utilizado es Breslow ya que es una variable continua y proporciona un índice más preciso (Josep *et al.*, 2005).

Nivel I	Lesiones limitadas a la epidermis (melanoma <i>in situ</i> ). Lesión no invasiva
Nivel II	Invasión de la dermis papilar, sin alcanzar la interfaz entre dermis papilar y reticular
Nivel III	La invasión llena y expande la dermis papilar, pero no penetra la dermis reticular
Nivel IV	Invasión de la dermis reticular, pero no del tejido subcutáneo
Nivel V	Invasión por toda la dermis reticular del tejido subcutáneo

**Figura 4. Clasificación de Clark**

Fuente:(Josep *et al.*, 2005).

La ulceración histológica se define como la ausencia de epidermis sobre el melanoma primario y su importancia es tal que cuando se detecta, el pronóstico empeora. El melanoma ulcerado se clasifica en un estadio inmediatamente superior al de un melanoma no ulcerado. La localización anatómica del melanoma es un factor independiente, de tal manera los pacientes que tienen lesiones en manos, pies y cuero cabelludo tienen peor pronóstico que pacientes que presentan la afección en el tronco y extremidad cefálica, los pacientes con mejor pronóstico son los que presentan melanoma en extremidades (excepto manos y pies) (Duncan, 2009).

La edad es un factor pronóstico independiente los pacientes mayores a 65 años especialmente si son varones tienen peor pronóstico y frecuentemente presentan metástasis a distancia probablemente por la inmunodepresión propia de la edad avanzada, los adultos jóvenes son más propensos a desarrollar melanoma local sin metástasis. Aunque no se han hecho estudios contundentes muchos autores sugieren que el género es una variable independiente y que revela que los varones tienen peor pronóstico que las mujeres independientemente de la edad (Ríos *et al.*, 2013).

El índice mitótico es la relación del número de mitosis por  $\text{mm}^2$  (mitosis/ $\text{mm}^2$ ), e influye en el melanoma de tal manera que en estudios previamente realizados se comprobó que el 95% de pacientes que tenían un índice mitótico de 0 sobrevivieron durante 8 años a diferencia de los que tenían un índice de 6 que solo sobrevivieron 38.2%.



De acuerdo al tipo de melanoma algunos autores sugieren el que el melanoma nodular tiene el peor pronóstico ya que este crece desde el comienzo en fase vertical sin embargo no hay datos suficientes para avalar esta información. Otros factores que generan controversia por falta de información pero que pueden indicar mal pronóstico es la invasión vascular, la regresión y la respuesta inflamatoria inmunitaria (Duncan, 2009; Oliveros *et al.*, 2012).

Para establecer el estadio y pronóstico del melanoma el sistema TNM (tumor-nódulo-metástasis) es el más utilizado. Este sistema fue creado por la AJCC (American Joint Committee on Cancer), la séptima edición que es la más actualizada, fue publicada en Diciembre del 2009 y describe la clasificación más adecuada para pronóstico y supervivencia del melanoma (Balch *et al.*, 2009).

La clasificación TNM se realiza por la AJCC en base a recopilación de investigaciones y de información clínica de pacientes alrededor del mundo, con el fin de establecer los factores más importantes para su pronóstico y para desarrollar una clasificación universal que permita entender de mejor manera la enfermedad. Como lo indica la figura 5A las 3 principales categorías que el sistema TNM utiliza son T (grosor del tumor), N (nódulos o ganglios linfáticos), M (metástasis).

En la categoría T se toman en cuenta el grosor del tumor medido en milímetros, si existe presencia o no de ulceración y el índice mitótico. En la categoría N se describe si el melanoma afectado a ganglios linfáticos, y también considera otros parámetros como el número de ganglios afectados, si existe micro o macro metástasis, si existen satélites o “metástasis en tránsito”.

El tercer parámetro de las categorías el M (metástasis) incluye parámetros como niveles de lactato deshidrogenasa en suero, si existe metástasis subcutáneas, metástasis hacia pulmones, o metástasis a otros órganos viscerales o a cualquier órgano, los pacientes que se encuentran en esta categoría son los que peor pronóstico tienen aproximadamente

sobreviven el 20% de pacientes en 5 años diagnosticados con melanoma (Balch *et al.*, 2009).

En la figura 5B se indica cómo se clasifica clínica y patológicamente a cada paciente diagnosticado con melanoma basándose en los 3 parámetros antes mencionados.

A			B						
TNM Staging Categories for Cutaneous Melanoma			Anatomic Stage Groupings for Cutaneous Melanoma						
Classification	Thickness (mm)	Ulceration Status/Mitoses	Clinical Staging*			Pathologic Staging†			
			T	N	M	T	N	M	
<b>T</b>									
Tis	NA	NA				0	Tis	N0	M0
T1	≤ 1.00	a: Without ulceration and mitosis < 1/mm <sup>2</sup> b: With ulceration or mitoses ≥ 1/mm <sup>2</sup>	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
			T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
T2	1.01-2.00	a: Without ulceration b: With ulceration	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
T3	2.01-4.00	a: Without ulceration b: With ulceration	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
T4	> 4.00	a: Without ulceration b: With ulceration	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
			T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
			T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
			T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
<b>N</b>									
N0	0	NA	Any T	N > N0	M0	III	T1-4a	N1a	M0
N1	1	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis†					T1-4a	N2a	M0
N2	2-3	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis† c: In transit metastases/satellites without metastatic nodes					IIB	T1-4b	N1a
							T1-4b	N2a	M0
							T1-4a	N1b	M0
							T1-4a	N2b	M0
							T1-4a	N2c	M0
							IIC	T1-4b	N1b
							T1-4b	N2b	M0
							T1-4b	N2c	M0
							Any T	N3	M0
<b>M</b>									
M0	No distant metastases	NA	IV	Any T	Any N	M1	IV	Any T	Any N
M1a	Distant skin, subcutaneous, or nodal metastases	Normal							
M1b	Lung metastases	Normal							
M1c	All other visceral metastases	Normal							
	Any distant metastasis	Elevated							

Abbreviations: NA, not applicable; LDH, lactate dehydrogenase.  
 \*Micrometastases are diagnosed after sentinel lymph node biopsy.  
 †Macrometastases are defined as clinically detectable nodal metastases confirmed pathologically.

\*Clinical staging includes microstaging of the primary melanoma and clinical/radiologic evaluation for metastases. By convention, it should be used after complete excision of the primary melanoma with clinical assessment for regional and distant metastases.  
 †Pathologic staging includes microstaging of the primary melanoma and pathologic information about the regional lymph nodes after partial (ie, sentinel node biopsy) or complete lymphadenectomy. Pathologic stage 0 or stage IA patients are the exception; they do not require pathologic evaluation of their lymph nodes.

**Figura 5. Clasificación TNM y criterios para clasificación en subgrupos**

Fuente: (Balch *et al.*, 2009).

### 1.5.2. Genes de metilación

La metilación del ADN juega un papel importante en el instante de la replicación y expresión génica. Alteraciones en la metilación del ADN se asocian con varias enfermedades, especialmente las relacionadas con procesos de transformación celular (De Marco *et al.*, 2001; Wang, Qiao, Feng, & Lv, 2008).

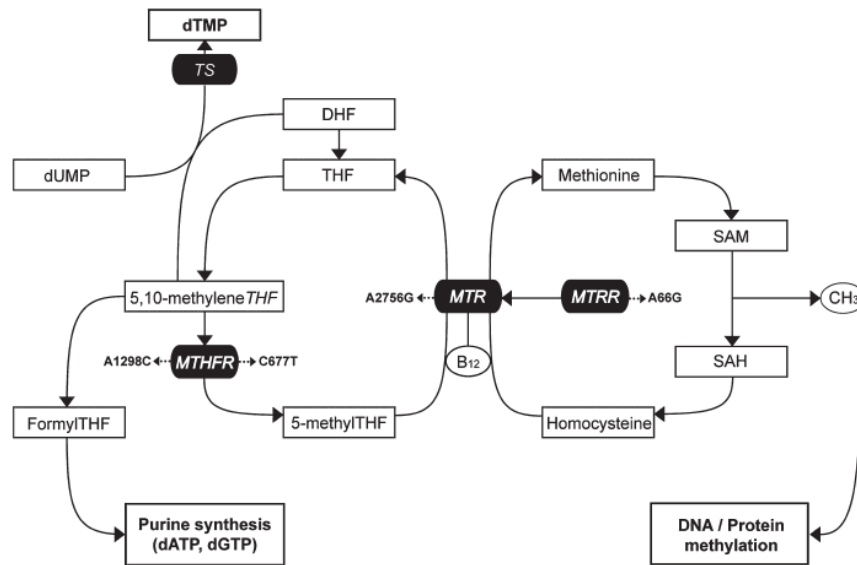
Los genes de metilación codifican enzimas llamadas ADN metiltransferasas, cuya función es la transferencia del grupo metilo, necesario para la metilación del ADN en el carbono 5 de la base nitrogenada citosina. Existen once enzimas que llevan a cabo este tipo de reacción química y se clasifican en dos grupos: las metilasas de novo y las metiltransferasas de mantenimiento (Lopez-Cortes *et al.*, 2015).

El papel de las ADN metiltransferasas de mantenimiento es metilar el ADN al inicio de la replicación. Solamente la cadena nueva de ADN será metilada, por lo tanto los patrones serán heredados de manera semiconservativa.

La enzima metionina sintasa reductasa (por sus siglas en ingles MSR) es codificada por el gen MTRR, la enzima metionina sintasa (MS) es codificada por el gen MTR y la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), es codificada por el gen que lleva su nombre (MTHFR) juegan un rol importante en el metabolismo de los folatos, el cual es una fuente de suma importancia para la metilación y síntesis del ADN y ARN (Lopez-Cortes *et al.*, 2013).

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa es una proteína de 656 aminoácidos y de una masa molecular de 74597, esta es codificada por el gen MTHFR localizado en el cromosoma 1p36.3, compuesto por once exones y 21.198 pares de bases (pb).

Como se indica en la figura 6, esta enzima cataliza la reacción irreversible del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato, en el cual se utiliza un grupo metilo, en donde se obtiene a partir de una remetilación de la homocisteína hacia metionina, siendo así un precursor de S-adenosilmetionina (SAM), factor indispensable para la metilación del ADN, proteínas, ARN y fosfolípidos (Wang *et al.*, 2008).



**Figura 6. Enzimas importantes en el ciclo del ácido fólico**

Fuente:(Lopez-Cortes *et al.*, 2013).

La remetilación de homocisteína a metionina es catalizada por MTR en una reacción dependiente de vitamina B12, como el portador del grupo metilo. La enzima MTR se vuelve inactiva cuando el cofactor de la remetilación (vitamina B12) es oxidada por la enzima MTRR. Por otra parte, el 5-10, metilentetrahidrofolato es utilizado por la enzima TS (Timidilato sintasa) durante la metilación de desoxiuridilato (dUMP) a desoxitimidilato (dTMP), el cual es la fuente de timidinas, requeridas para la reparación y síntesis del ADN (Lesiak *et al.*, 2011; Lopez-Cortes *et al.*, 2015).

Aproximadamente el 10% de la población caucásica es homocigota en el cambio de C/T en el nucleótido 677 en el gen MTHFR. Esta mutación convierte de alanina a valina en el codón 222, la cual está asociada con la reducción de actividad enzimática, la disminución en la concentración de folatos en el plasma y la metilación del ADN en pacientes con cáncer (De Marco *et al.*, 2001).

### 1.5.3. Polimorfismos de nucleótido simple

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia de ADN entre individuos diferentes es la misma, el 0.1% de variación de esta secuencia es responsable de diferencias fenotípicas entre individuos y susceptibilidad a ciertas enfermedades.(Checa, 2007). Estas variaciones en la secuencia de ADN pueden ser mutaciones o polimorfismos. Las mutaciones son cambios en el ADN fuera de lo normal en donde un alelo normal prevalente en la población cambia en una variable rara. Las mutaciones genéticas están en menos del 1% en la población (Karki, Pandya, Elston, & Ferlini, 2015).

Los polimorfismos por el contrario son variaciones en la secuencia de ADN que son comunes en la población y no hay un alelo considerado como “normal” (Karki *et al.*, 2015). Los polimorfismos de nucleótido simple con sus siglas en inglés (SNP) se consideran la forma más común de polimorfismos, consiste en la variación en una solo base nitrogenada en la secuencia de ADN. Sus variantes o alelos se distribuyen en todo en el mundo en más del 1% en la población (Ramirez, Vargas, Tovilla, & Fragosó, 2013).

En el genoma humano se presentan SNP aproximadamente cada 200 pb por lo que se prevé que existen unos 6 millones de polimorfismos de este tipo, muchos de los cuales ya han sido descritos en dbSNP (por sus siglas en inglés base pública de datos SNP). Los SNP se pueden encontrar en diferentes partes de un gen como exones, intrones, regiones promotoras, sitios de splicing, o regiones intragénicas (Checa, 2007).

En el presente trabajo se estudian polimorfismos de nucleótido simple ubicados en exones de los genes, es decir están presentes en regiones codificantes y provocan cambios de aminoácidos por lo que se les conoce como “no sinónimo”, afectando directamente a la función de la proteína y por ende generando cambios en el metabolismo celular (Ramirez *et al.*, 2013)

Los SNP se han usado como marcadores de ciertas enfermedades ya que la presencia de estos se relacionan con el riesgo de presentar enfermedades o progresión de las mismas. Por ello se ha utilizado este

marcador en un estudio directo para comprobar si los polimorfismos se asocian con el riesgo de tener melanoma y ver cómo está distribuida su frecuencia alélica y genotípica en la población de individuos afectados tanto como la población de individuos sanos.

## CAPÍTULO 2 : METODOLOGIA

### 2.1. Recolección de muestras patológicas y controles

Se recolectaron 100 biopsias fijadas en parafina de pacientes diagnosticados con melanoma maligno, 30 de estas se obtuvieron del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) y 70 del Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala (SOLCA - QUITO).

Las muestras del grupo control se obtuvieron del banco de muestras del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) el mismo donde se realizó el trabajo de laboratorio.

Debido a la disponibilidad de las muestras, el grupo control constaba de 305 personas entre hombres y mujeres entre 30 y 80 años los criterios de inclusión se encuentran detallados en la Tabla1.

**Tabla 1.**

#### **Criterios inclusión/exclusión para casos y controles del presente estudio.**

<b>Criterio</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Inclusión</b>	Personas diagnosticadas con melanoma. Personas ecuatorianas. Pacientes con historia clínica.	Personas no diagnosticadas con melanoma, sin antecedentes de la enfermedad. Personas ecuatorianas Personas con historial clínico
<b>Exclusión</b>	Personas no diagnosticadas con melanoma Personas no ecuatorianas Pacientes sin historial clínico	Personas diagnosticadas con melanoma. Personas no ecuatorianas. Pacientes sin historia clínica.

## 2.2 Extracción de ADN

Para obtener ADN genómico de casos y controles se utilizó el Kit de extracción PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, USA), para el caso de los controles el material genético se obtuvo de sangre periférica y para el caso de casos se obtuvo de tejido embebido en parafina. El protocolo de extracción constaba de digestión, lisis, lavado y elución de ADN, las muestras de parafina se prepararon previamente con 2 lavados de Xilol y Etanol (Invitrogen, 2014).

Para las muestras de sangre periférica se siguieron los lineamientos establecidos por el kit comercial para ese tipo de muestra, sin embargo para las muestras fijadas en parafina, se realizaron modificaciones del protocolo inicial, como se detalla en el Anexo 3 y Anexo 4 (Invitrogen, 2014; Lopez-Cortes *et al.*, 2015).

## 2.3 Cuantificación de ADN

Para realizar un análisis cuantitativo de la concentración y pureza del ADN se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000 de la casa comercial *Thermo Scientific*. Se calibró el equipo con el buffer de elución y se colocó 2 ul de ADN de cada muestra para su cuantificación.

La medición mediante espectrometría de la luz UV absorbida por las bases nitrogenadas es la más adecuada en donde se toman lecturas de densidad óptica (D.O.) o absorbancia ( $A$ ), a longitudes de onda de 260nm y 280nm. La relación  $A_{260}/A_{280}$  indica un estimado de la pureza de la muestra. Si los valores de la relación  $A_{260}/A_{280}$  se encuentran entre 1,8 - 2 tendremos ADN prácticamente puro, si tenemos valores mayores o menores de este rango, la muestra presenta contaminación por otros compuestos como proteínas, fenol, carbohidratos o incluso otros ácidos nucleicos (Gallagher & Desjardins, 2001).



## 2.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de la región donde se encuentra cada polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La PCR es una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia que aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente ADN, replicando hebras separadas del mismo en millones de copias. Esta herramienta molecular genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar (Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

### 2.4.1 Diseño de cebadores para cada polimorfismo

Se diseñaron primers o cebadores que flanqueen la secuencia de interés para cada SNP, mediante el uso de la herramienta bioinformática Primer Blast de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Tabla 2.**

**Parámetros generales de primers diseñados en el presente estudio.**

SNP	Rs	Longitud del amplicon (pb)	Secuencia del primer	Tamaño del primer (pb)	T <sub>m</sub> °C
<b>MTHFR C677T</b>	rs18011 33	278	FW 5'- GCAAGATCAGAGCCCCAAA -3'	20	60.32
			RV 5'- AAGTGATGCCCATGTCCGGTG -3'	20	60.68
<b>MTHFR A1298C</b>	rs18011 31	176	FW 5'- TGGGGAGCTGAAGGACTACT -3'	20	59.78
			RV 5'-CCACTCCAGCATCACTCACT-3'	20	59.57
<b>MTR A2756G</b>	rs18050 87	344	FW 5'- CCAGGCAGGAATTAGCACAG -3'	20	58.61
			RV 5'- GCCTTTTACTACTCCTCAAACC -3'	22	57.76
<b>MTRR A66G</b>	rs18013 94	205	FW 5'- TCCCCATTTTTCAGTTTCA -3'	20	55.02
			RV 5'- GCACAAAACGGTAAAATCCAC -3'	21	56.61

Según Dietrich (2013), la calidad de la PCR efectuada con ADN proveniente de tejido fijado en parafina empieza a decaer con tamaños de ampliaciones mayores de 350 pb, debido a que el ADN suele estar degradado, inhibiendo la acción de la polimerasa. Por tal razón, para el diseño de cebadores se tomó en cuenta que el tamaño del amplicón generado no sea

mayor a 350 pb. Los cebadores para cada SNP se usaron tanto para controles como para casos (Dietrich *et al.*, 2013). La información de los 4 pares de cebadores diseñados se muestra en la Tabla 2.

### 2.4.2 Amplificación de polimorfismos

Los 4 polimorfismos de nucleótidos simple (SNP) analizados se distribuyen en 3 genes, 2 polimorfismos se encuentran en el gen MTHFR (MTHFR C677T y MTHFR A1298C) un polimorfismo en el gen MTR (MTR A2756G) y el ultimo en el gen MTRR (MTRR A66G).

Para todos los polimorfismos se estandarizó una misma master mix con los siguientes componentes: Agua Mili-Q, 5x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega, USA), MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer Forward, Primer Reverse, Taq DNA polymerase Platinum® y ADN genómico, las concentraciones y volúmenes finales e iniciales de cada reactivo se muestra en la tabla 3 el volumen final de reacción fue llevado a 16 µl.

**Tabla 3.**

**Mater mix estandarizada para cada polimorfismo en la reacción de PCR.**

Componente	Stock	Dilución	Conc. Final	Vol1x(µl)
Agua MQ				9.15
Buffer	5X		1x	3.2
MgCl <sub>2</sub>	50Mm		3mM	0.96
DNTPs	100Mm	10mM	0,2mM	0.32
Forward	100uM	10uM	0,2uM	0.32
Reverse	100Um	10uM	0,2uM	0.32
Taq	500U		4U	0.13
ADN	40ng/ul		4ng/µl	1.6
			Vol total	16

La reacción de PCR para cada SNP fue llevada a cabo en el termociclador MultiGene TC9600-G® (Labnet, NJ, USA), las condiciones de la PCR son las mismas para todos los polimorfismos, exceptuando el número de ciclos y la temperatura de hibridación o de annealing que depende de cada par de primers y se visualizan en la Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6 y Tabla 7.

Para establecer la temperatura de hibridación se realizó gradientes de temperatura tomando un rango de temperaturas  $\pm 5^\circ$  del promedio de la  $T_m$  (proveniente de la casa comercial de los primers), se tomó la temperatura más adecuada donde la banda del amplificado en el gel de agarosa al 2% se vea más intensa, y se generen la menor cantidad de dímeros posibles.

**Tabla 4.**

**Programa de PCR usado para el polimorfismo MTHFR C677T**

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA	#CICLOS
DENATURACION INICIAL	05:00	95°	1
DENATURACION	00:30	94°	35
HIBRIDACION	00:45	62°	
ELONGACION	00:45	72°	
ELONGACION FINAL	07:00	72°	1

**Tabla 5.**

**Programa de PCR usado para el polimorfismo MTHFR A1298C**

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA	#CICLOS
DENATURACION INICIAL	05:00	95°	1
DENATURACION	00:30	94°	40
HIBRIDACION	00:45	58°	
ELONGACION	00:45	72°	
ELONGACION FINAL	07:00	72°	1

**Tabla 6.**

**Programa de PCR usado para el polimorfismo MTR A2756G**

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA	#CICLOS
DENATURACION INICIAL	05:00	95°	1
DENATURACION	00:30	94°	35
HIBRIDACION	00:45	55°	
ELONGACION	00:45	72°	
ELONGACION FINAL	07:00	72°	1

**Tabla 7.****Programa de PCR usado para el polimorfismo MTRR A66G.**

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA	#CICLOS
<b>DENATURACION INICIAL</b>	05:00	95°	1
<b>DENATURACION</b>	00:30	94°	38
<b>HIBRIDACION</b>	00:45	54°	
<b>ELONGACION</b>	00:45	72°	
<b>ELONGACION FINAL</b>	07:00	72°	1

**2.5 Electroforesis horizontal convencional**

La visualización de los amplicones se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta consiste en la separación de fragmentos de ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. En el caso del ADN el grupo fosfato le proporciona carga negativa, por lo que durante la electroforesis migra hacia el polo positivo (Tamay *et al.*, 2013). En este caso la matriz sólida por donde migrara el ADN es gel de agarosa que se preparó diluyendo mediante calor la agarosa liofilizada en buffer TBE (Tris-borato-EDTA)1X. Antes de que se solidifique el gel se añadió 1µl de bromuro de etidio (10mg/ml) por cada 20ml de gel.

El bromuro de etidio es una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena, cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas (Bolívar Sánchez, Rojas E., & García Lugo, 2014; Tamay *et al.*, 2013). La concentración final del gel de agarosa fue de 2% (mg/ml) ya que genera un tamaño de poro adecuado para los amplicones que se analizaron (50 -2000 pb) (Promega., 2015).

En cada pocillo del gel se cargó 10 µl de producto de PCR que corrieron a 100V durante 30 minutos. Las bandas se observaron con la ayuda de un transiluminador con luz UV.

## **2.6 Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar**

Previo a la secuenciación del ADN de casos y controles los productos de PCR se purificaron con el método de perlas magnéticas (AMPure), posteriormente se realizó la PCR de secuencia y así mismo los productos de esa PCR se purificaron mediante CleanSeq, para ser llevados a electroforesis capilar.

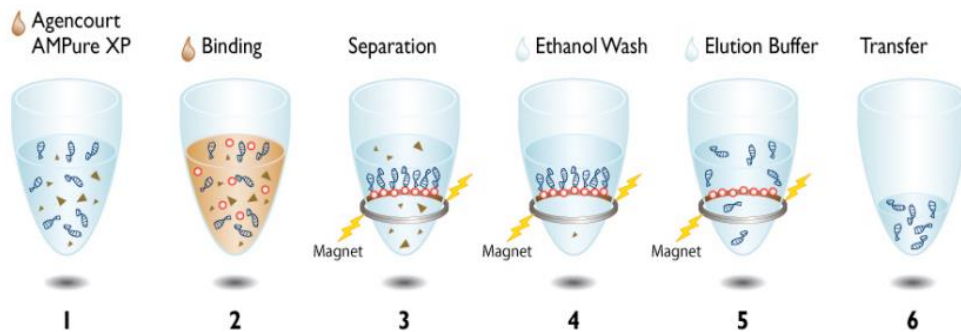
### **2.6.1. Purificación de producto de PCR mediante ampure.**

Frecuentemente los productos de PCR no solo contienen los fragmentos de ADN de nuestro interés, pueden presentar excesos de primers, dímeros, nucleótidos, sales y enzimas que no han sido aprovechada en la reacción, estos residuos pueden interferir considerablemente en la secuenciación expresándose como ruido. Por lo que es necesario limpiar estos desechos para obtener ADN libres de contaminantes. Por lo que se usó el Kit Agencout AMPuere XP (Beckman Coulter, USA).

Es un reactivo que utiliza un sistema de perlas magnéticas con alta afinidad al ADN, utiliza separación magnética y no requiere centrifugación o filtración al vacío. El sistema tiene alta eficiencia de purificación con amplicones de 100pb en adelante (Beckam Coulter, 2016).

Se procedió con la purificación estabilizando el AMPure a temperatura ambiente y homogenizándolo con vórtex. En un tubo eppendorf estéril de 0.2 ml se añadió 10µl del producto de PCR y 15 µl de AMPure, la mezcla se homogenizó con vortex durante 30 segundos y se dejó reposar durante 5 minutos, una vez transcurrido el tiempo se colocó el tubo sobre la placa magnética y de igual manera se dejó reposar 5 minutos, como se muestra en la figura 7 en este paso se formó una anillo en las paredes del tubo que contenía el ADN adherido a las perlas magnéticas. Una vez transcurrido este tiempo se evidencia que el líquido sobrenadante queda totalmente claro y con la ayuda de una micropipeta se retiró todo el volumen del líquido intentando no tocar el anillo de las paredes del tubo.

Para realizar los lavados se añadieron 200  $\mu$ l de etanol al 70% en el tubo y se dejó reposar durante 30 segundos, se colocó papel toalla sobre la placa y se eliminó el alcohol por inversión, se realizó el lavado con alcohol y su eliminación nuevamente. Con la ayuda de una micropipeta se aspiró los remanentes de alcohol y se secó la placa magnética en la estufa a 37°C durante 20 minutos.



**Figura 7. Esquema general de purificación con AMPure®.**

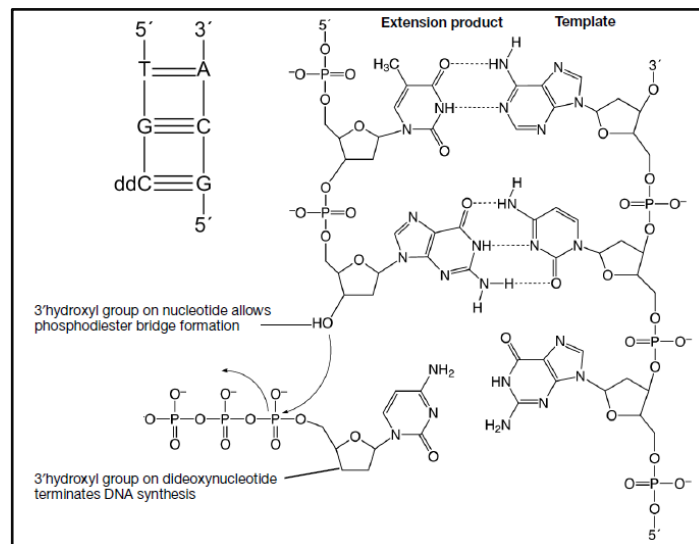
Transcurrido el tiempo se verificó que no queden remanentes de alcohol. Con el fin de resuspender la muestra se colocó 20  $\mu$ l de agua mili-Q en el tubo y se agitó mediante vortex hasta que las perlas se desprendan de las paredes del tubo y formen una mezcla homogénea con el agua, de esta manera se da una transferencia del material genético al agua por tener mayor afinidad. Finalmente se colocó el tubo nuevamente en la placa se dejó incubar durante 30 segundos y se tomó el sobrenadante que tiene el producto purificado, evitando tomar las perlas magnéticas.

### 2.6.2 PCR de Secuenciación

Para secuenciar los fragmentos de ADN previamente purificados se utilizó la técnica de secuenciación dideoxi de Sanger. Este es una variación de PCR que incluye dideoxinucleótidos (ddNTPs) en el master mix. Estos dideoxinucleótidos están marcados con un fluorocromo y están modificados

de tal manera que han perdido el grupo hidroxilo (OH) en la posición 3' que es esencial en la formación de enlaces fosfodiéster (Karger & Guttman, 2009).

Una vez que el primer o cebador se ha unido a la cadena molde por complementariedad de bases, la ADN polimerasa empieza a sintetizar ADN desde el extremo 3' del primer, añadiendo los nucleótidos (dNTPs) y extendiendo la cadena sin problema, sin embargo como lo muestra la Figura 8 cuando la ADN polimerasa incorpora ddNTPs la extensión de la cadena se termina ya que al no tener un grupo hidroxilo en el extremo 3' es imposible seguir añadiendo más nucleótidos, generando productos de tamaños variados que tienen ddNTPs marcados con fluorocromos al final de su cadena (Applied Biosystems, 2009)



**Figura 8. Incorporación de nucleótidos en el ADN**

**Fuente: (Applied Biosystems, 2009).**

Para efectuar la reacción de PCR se utilizó un kit de secuencia de Applied Biosystems, USA que contenía *BigDye Terminator v3.1* y *BigDye Terminator Sequencing Buffer 5x*, así mismo se añadió agua Mili-Q, el templado de ADN amplificado y purificado previamente y en cada reacción solo uno de los dos cebadores sea forward o reverse. Para cada SNP se realizó 2 reacciones, una por cada cebador (fw/rv) y se utilizó la misma master mix en todos los casos. La PCR de secuencia se realizó en el termociclador

SureCycler 8800 (Agilent, USA) a un volumen final de 6  $\mu$ l y las concentraciones y volúmenes de cada reactivo se especifican en la Tabla 8.

**Tabla 8.**

**Conformación de la master mix para la PCR de secuencia.**

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen X 1 (uL)
Agua Mili-Q			1.5
BigDye® Terminator mix v 3.1			0,5
BigDye Terminator Sequencing Buffer 5x	5X	0.75 X	0.9
Primer Fw/Rv	1 uM	0,27 uM	1,6
ADN amplificado			1,5
Volumen Final de Reacción			6

La reacción se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (*Agilent, USA*) y el programa empleado se visualiza en la Tabla 9.

**Tabla 9.**

**Parametros utilizados para la PCR de secuencia.**

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA	#CICLOS
DENATURACION INICIAL	03:00	95°	1
DENATURACION	00:10	96°	25
HIBRIDACION	00:05	50.5°	
ELONGACION	04:00	60°	

**2.6.3 Purificación de PCR de secuenciación mediante clean SEQ**

Una vez terminada la PCR de secuencia es necesario purificar los fragmentos marcados para que residuos de nucleótidos, sales o enzimas no interfieran en la electroforesis capilar, para esto se utilizó el reactivo Agencourt CleanSeq® (Beckman Coulter, USA) que utiliza el mismo principio de perlas magnéticas que *Agencout AMpuere XP* explicado antes. Primeramente se estabilizado el CleanSeq a temperatura ambiente y se homogenizó con vortex. En el mismo tubo eppendorf que contiene los 6  $\mu$ l de producto amplificado se



colocó 2  $\mu\text{l}$  de CleanSeq y 16,2  $\mu\text{l}$  de alcohol al 85% la mezcla se homogenizó con vortex y se incubó en la placa magnética durante 3 minutos. Con la ayuda de una micropipeta se retiró el líquido sin tocar el anillo ya formado en las paredes del tubo. Para realizar los lavados se agregó 100  $\mu\text{l}$  de alcohol al 85% en el tubo y se incubó durante 30 segundos, se procedió a colocar papel toalla sobre la placa magnética y eliminar el alcohol por inversión, se repitió el lavado con alcohol una vez más y se retiró los excesos de alcohol con micropipeta para luego incubar la placa magnética en la estufa a 37° durante 20 minutos.

Una vez que el alcohol se evaporó completamente se resuspendieron las perlas magnéticas agregando 20  $\mu\text{l}$  de agua Mili-Q en los tubos. Se retiraron las muestras de la placa magnética y se agitó mediante vortex aproximadamente durante 30 segundos hasta que las perlas magnéticas se desprendan totalmente del tubo y se vea una mezcla homogénea. Se colocó nuevamente los tubos en la placa magnética se esperó 30 segundos y con el anillo formado en las paredes del tubo se tomó únicamente el líquido que contenía el ADN ya purificado. El producto se colocó directamente en la placa de secuenciación de 96 pocillos (Applied Biosystems) para ser analizados en el secuenciador.

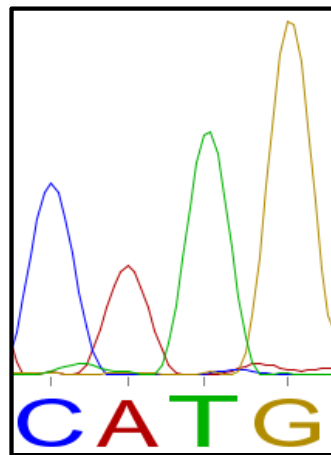
#### **2.6.4 Electroforesis capilar**

El equipo utilizado para efectuar la electroforesis capilar fue el secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Austin, TX). Durante el proceso de electroforesis los productos de extensión obtenidos en la reacción de secuencia fueron llevados hacia el capilar por inyección electrocinética. En el proceso se aplica alto voltaje al buffer de secuencia ocasionando que el ADN que es cargado negativamente migre hacia el polo positivo. La velocidad con la que los fragmentos de ADN viajan a través del capilar es inversamente proporcional a su peso molecular (Applied Biosystems, 2009).

De tal manera que los fragmentos más pequeños migran más rápido por el capilar que los fragmentos de tamaños mayores. Antes de llegar al ánodo hay un láser que excita los fluorocromos que emiten luz en una longitud

de onda distinta de acuerdo al respectivo ddntp, un dispositivo óptico detecta y distingue cada base con un color diferente (Applied Biosystems, 2009).

El software del equipo Sequencing Analysis (Applied Biosystems®) convierte la señal de fluorescencia a datos digitales gravados en formato .abi representando a cada nucleótido como un pico de un color diferente: Citosina en azul, Adenina en rojo, Timina en verde y Guanina en amarillo (Figura 9), de esta forma podemos ir viendo la secuencia de nucleótidos que se han ido incorporando en la reacción (Applied Biosystems, 2009). El proceso de electroforesis puede separar los productos de extensión por tamaño con una resolución de una base teniendo un 99% de precisión (Applied Biosystems, 2009; Karger & Guttman, 2009).



**Figura 9. Electroferograma asignado un color a cada base nitrogenada.**

## 2.7 Análisis estadístico

Una vez secuenciadas las muestras de cada individuo se determinaron los genotipos de acuerdo a cada polimorfismo estudiado. Tanto de casos como de controles se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo con el fin de evaluar el principio de Hardy-Weinberg usando la herramienta bioinformática disponible en <http://www.genes.org.uk/software/hardy-weinberg.shtml>. Con el uso del programa estadístico IBM SPSS 23 Software (SPSS Inc, Chicago, IL), se realizó la prueba estadística chi cuadrado ( $X^2$ ) y odds ratio (OR) con un

intervalo de confianza del 95% en tablas de contingencia 2x2, para determinar la asociación del riesgo de presentar cáncer de piel tipo melanoma y la presencia de los diferentes SNP's.

## CAPÍTULO 3 : RESULTADOS

### 3.1 Extracción y evaluación de muestras de ADN

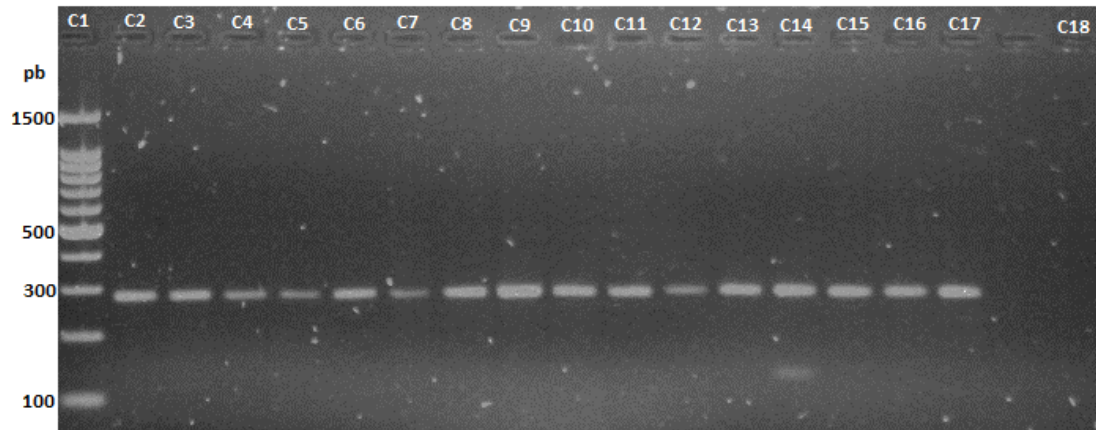
Una vez obtenido el ADN genómico de los grupos casos y controles se evaluó la concentración mediante el uso de Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA).

La concentración promedio de ADN de las muestras de casos (biopsias embebidas en parafina) fue de 175.80 ng/μl siendo la concentración más baja 5.2 ng/μl y la más alta 885.9 ng/μl. La concentración promedio de ADN del grupo control (sangre periférica) fue de 35,15 ng/μl siendo la concentración más baja 8,8 ng/μl y la más alta 161,4 ng/μl.

### 3.2 Amplificación de ADN mediante PCR

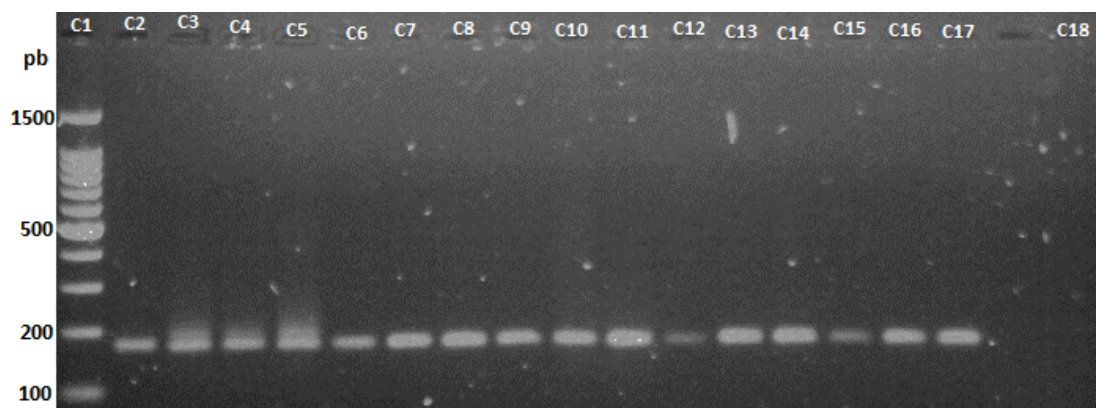
Mediante la técnica de PCR explicada anteriormente se amplificó fragmentos de ADN que contenían el polimorfismo de interés de cada gen. Para el análisis del polimorfismo MTHFRC677T se amplificó un fragmento de 278 pb, contenido en el cromosoma 1p36, exón 4; para el polimorfismo MTHFRA1298C un fragmento de 176 pb ubicadas en el cromosoma 1p36 en el exón 7; para el polimorfismo MTR A2756G un fragmento de 344 pb del cromosoma 1q43 exón 26 y para el polimorfismo A66G del gen MTRR un fragmento de 205 pb ubicadas en el cromosoma 5p15, exón 2.

La amplificación de los 4 genes se realizó en las 100 muestras de individuos afectados con melanoma y en las 305 muestras de individuos sanos. En las figuras (10, 11, 12 y 13), se muestran las corridas electroforéticas de cada amplicon, realizadas en gel de agarosa al 2% teñido previamente con bromuro de etidio. En cada ensayo se incluyen controles negativos, que es la master mix sin ADN, lo cual ayuda a corroborar que no haya contaminación durante la PCR o en la manipulación de los amplificadas.



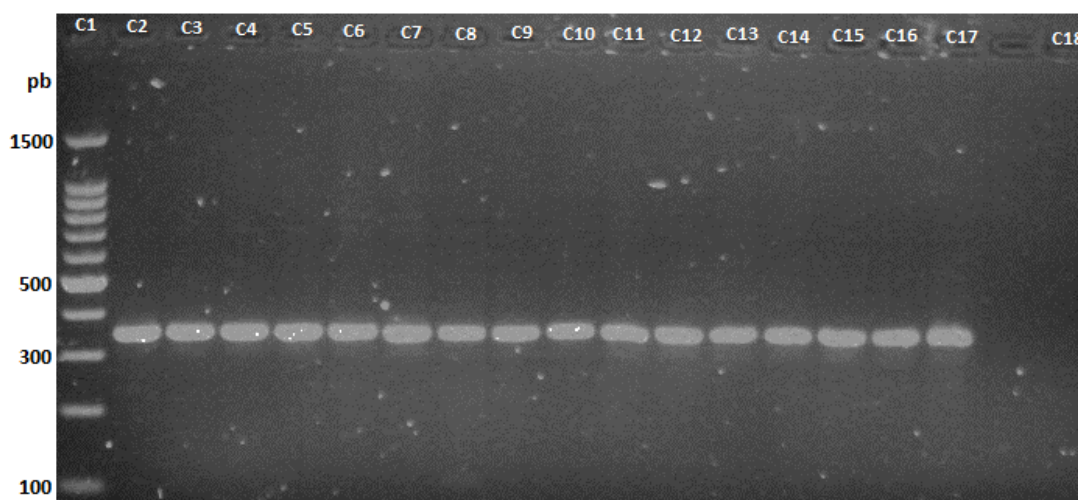
**Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 278 pb del gen MTHFR (variante C677T).**

Carril C1: Marcador de peso molecular 100pb. Carril C2-C9: Amplicones de 278 pb de muestras de pacientes diagnosticados con melanoma. Carril C10-C17: Amplicones de 278 pb de muestras de individuos controles. Carril C18: Control negativo: (master mix sin ADN).



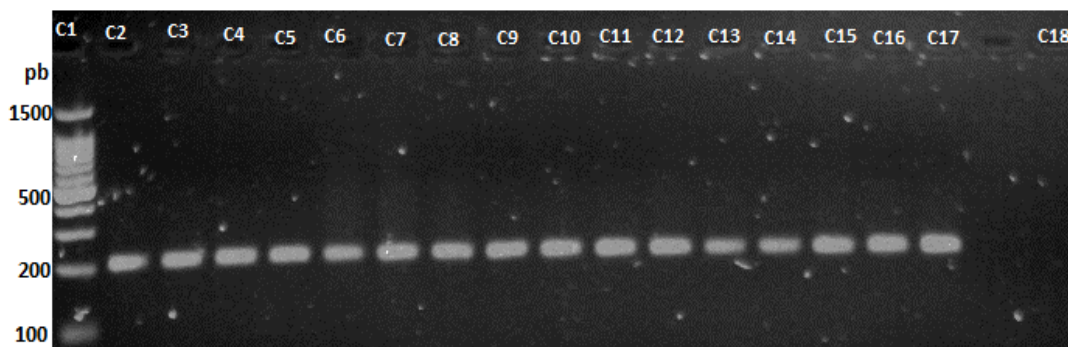
**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 176 pb del gen MTHFR (variante A1298C).**

Carril C1: Marcador de peso molecular 100pb. Carril C2-C9: Amplicones de 176 pb de muestras de pacientes diagnosticados con melanoma. Carril C10-C17: Amplicones de 176 pb de muestras de individuos controles. Carril C18: Control negativo: (master mix sin ADN).



**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 344 pb del gen MTR (variante A2756G).**

**Carril C1:** Marcador de peso molecular 100pb. **Carril C2-C9:** Amplicones de 344 pb de muestras de pacientes diagnosticados con melanoma. **Carril C10-C17:** Amplicones de 344 pb de muestras de individuos controles. **Carril C18:** Control negativo: (master mix sin ADN).



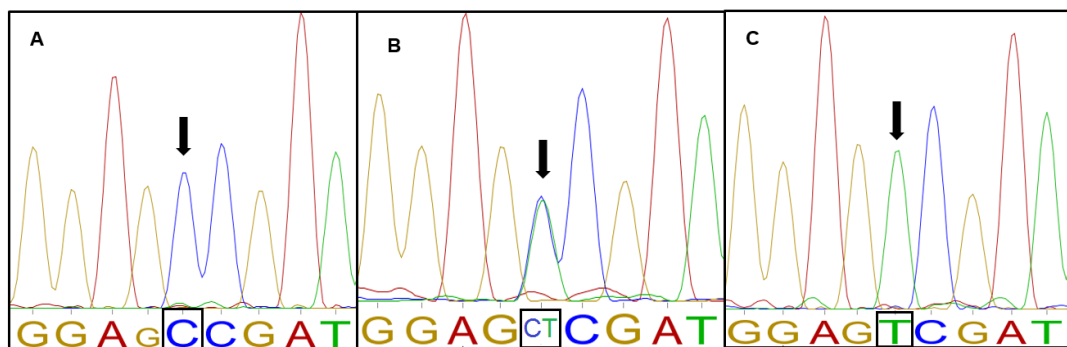
**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2%de amplicones de 205 pb del gen MTRR (variante A66G).**

**Carril C1:** Marcador de peso molecular 100pb. **Carril C2-C9:** Amplicones de 205 pb de muestras de pacientes diagnosticados con melanoma. **Carril C10-C17:** Amplicones de 205 pb de muestras de individuos controles. **Crril C18:** Control negativo: (master mix sin ADN).

### 3.3 Identificación de genotipos mediante electroforesis capilar

Mediante la técnica de electroforesis capilar se secuenciaron todos los fragmentos de ADN previamente amplificados y purificados. Se obtuvo el genotipo de los cuatro genes para los 100 casos y 305 controles.

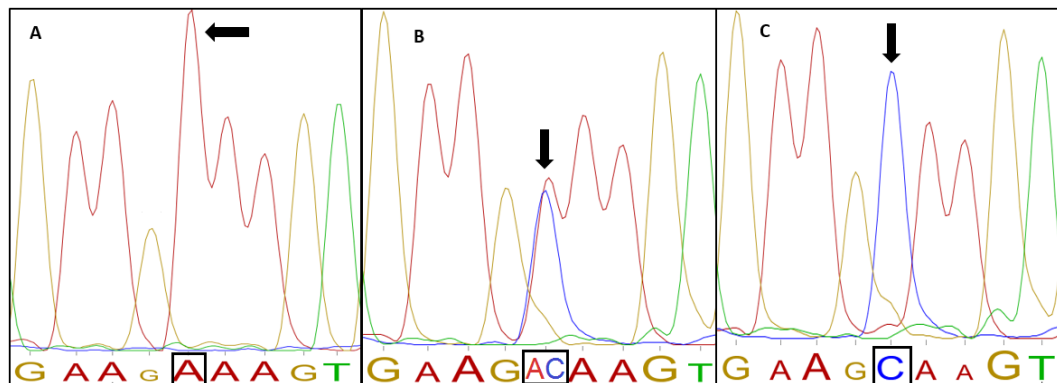
En los electroferogramas obtenidos tanto en el grupo control como casos se encontraron las tres variables genotípicas posibles para cada gen. La figura 14 muestra el electroferograma del gen MTHFR y sus variantes polimórficas C677T, indicando el cambio de timina por citosina en individuos que presentan la mutación en la posición 677 del gen. En el panel A se indica el genotipo de individuos homocigotos normales (C/C) viéndose la citosina como un pico de color azul, en el panel B se observa individuos heterocigotos (C/T) presentando curvas verdes y azules sobrepuestas, el panel C muestra el genotipo de personas con la mutación homocigota (T/T) indicando la presencia de timina, con un pico de color verde.



**Figura 14. Electroferograma de variantes genotípicas del polimorfismo MTHFR C677T.**

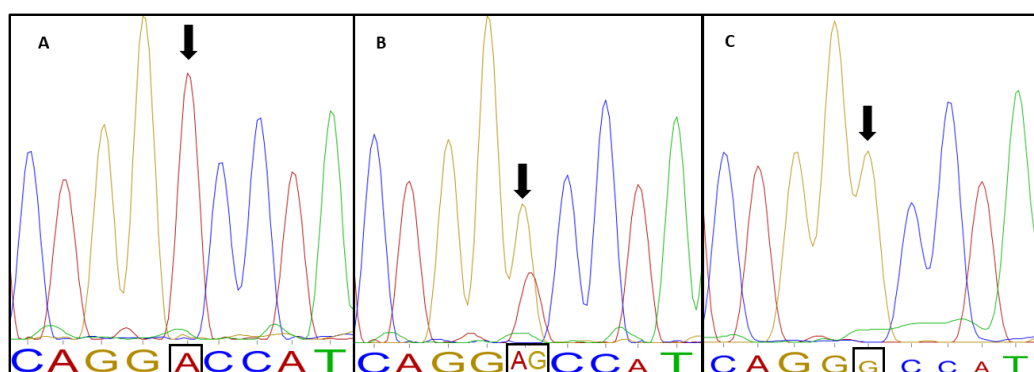
En la figura 15 se indican las variables genotípicas obtenidas del gen MTHFR A1298C, presentando cambio de nucleótido de una citosina por una adenina en la posición 1298, en personas portadoras de la mutación. En el panel A se encuentra el genotipo de individuos homocigotos normales (A/A), que se ve como un pico de color rojo, el panel B muestra el genotipo de

individuos homocigotos (A/C) con una curva roja (adenina) sobrepuesta con una curva azul (citosina), finalmente el panel C indica personas homocigotas para la mutación (C/C) mostrándose como un pico de color azul (citosina).



**Figura 15. Electroferograma de variantes genóticas del polimorfismo MTHFRA1298C.**

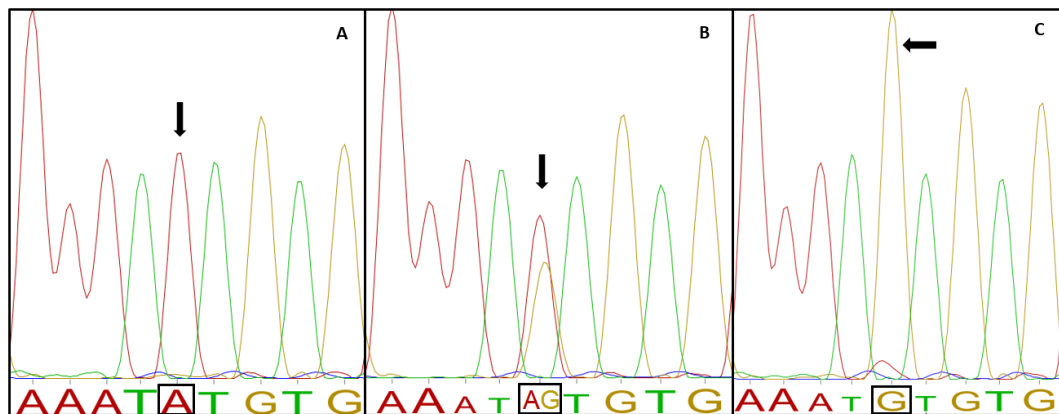
Para el polimorfismo MTR A2756G las tres variantes genéticas obtenidas se presentan en la figura 16, en donde el panel A indica los individuos homocigotos normales (A/A) representados con un pico de color rojo (adenina), los individuos heterocigotos (A/C) se indican en el panel B con picos de color rojo y amarillo sobrepuesto y los individuos homocigotos mutantes (C/C) representados con un pico de color amarillo (guanina).



**Figura 16. Electroferograma de variantes genóticas del polimorfismo MTRA2756G.**



El polimorfismo MTRR A66G que tiene sustitución de guanina por adenina en personas con la mutación, también presenta tres variantes genotípicas, en el panel A de la figura 17 se muestra el genotipo homocigoto normal (A/A) representado con un pico de color rojo (adenina), en el panel B el genotipo heterocigoto (A/G) representado un pico rojo y amarillo sobrepuestos y el genotipo homocigoto mutante (G/G) representado por un pico de color amarillo (guanina).



**Figura 17. Electroferograma de variantes genotípicas del polimorfismo MTRRA66G.**

### 3.4 Análisis estadístico

#### 3.4.1 Historiales Clínicos

En el presente estudio se analizaron 100 muestras de tejido tumoral fijado en parafina de pacientes diagnosticados con melanoma en el periodo del 2008 al 2015, las muestras se otorgaron por el departamento de patología del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) y el Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala (SOLCA - QUITO).

Las historias clínicas de los pacientes proporcionan importante información para el presente estudio, la información requerida fue: edad, género, localización anatómica del melanoma, clasificación TNM, clasificación Breslow, clasificación Clark, bordes quirúrgicos, tipo clínico-histológico de

melanoma. Con respecto al grupo control se tomó 305 muestras disponibles del banco de ADN del Instituto de investigaciones biomédicas.

La población control fue autodenominada mestiza sin antecedentes de melanoma familiar, ni hábitos de fumar o ingerir bebidas alcohólicas, se eligieron al azar 195 muestras de mujeres y 110 muestras de hombres.

Tanto la información de casos como controles se recolectó en una base de datos para sus respectivos análisis. La distribución de las variables obtenidas de las historias clínicas de los pacientes se muestra en la Tabla 10, Tabla 12, y Tabla 15.

#### 3.4.1.1 Distribución por edad y género

De las 100 muestras de pacientes diagnosticados con melanoma 55% correspondieron al sexo femenino y 45% al sexo masculino. La edad media de los individuos afectados fue de 67 años cuyo rango varió de 23 a 93 años.

La distribución presentada en la Tabla 10, indica que 6.7% de hombres diagnosticados comprenden edades <35 años, el mismo porcentaje en hombre entre 35-45 años, y el mayor porcentaje de hombres se encuentra en edades de  $\geq 50$  años con un porcentaje de 86.7%, la frecuencia en mujeres fue de 1.8% en edades <35, 10.9% en edades comprendidas entre 35-49 y 87.3% en edades mayores o iguales a 50 años.

Para ambos sexos el mayor porcentaje de personas afectadas se encuentra en personas con 50 años o más con 87%.

**Tabla 10.**  
**Distribución de edad y género en casos.**

Edad	Hombres	Porcentaje%	Mujeres	Porcentaje%	Total
<35	3	6.7	1	1.8	4(4%)
35-49	3	6.7	6	10.9	9(9%)
$\geq 50$	39	86.7	48	87.3	87(87%)
<b>TOTAL</b>	45	100.0	55	100.0	100

Para el grupo control la edad media fue de 45 años y en la Tabla 11 se muestra la distribución de edades y genero del grupo.

**Tabla 11.**

**Distribución de edad y género en controles.**

Edad	Hombres	Porcentaje%	Mujeres	Porcentaje%	Total
<35	32	29.1	60	30.8	92(30.2%)
35-49	33	30.0	77	39.5	110(36%)
≥ 50	45	40.9	58	29.7	103(33.8%)
<b>TOTAL</b>	110	100.0	195	100.0	305(100%)

**3.4.1.2 Localización anatómica del melanoma.**

La clasificación anatómica es el lugar del cuerpo donde se desarrolla el melanoma y según (Josep *et al.*, 2005) la localización es un factor pronostico importante para ver el avance de la enfermedad.

En este estudio se encontró que el mayor porcentaje (54%) de las personas afectadas presentaba melanoma en manos, pies o cuero cabelludo, 13% de casos presentaba melanoma en extremidades (menos manos y pies), 25% de individuos afectados presentaba melanoma en extremidad cefálica y 8 individuos en el tronco.

**3.4.1.3 Clasificación patológica TNM**

En cuanto la clasificación TNM (tumor, nódulo, metástasis), las muestras tumorales obtuvieron los siguientes resultados: 71% de los casos se encontraron en estadios T1-T2 que comprenden la clasificación patológica: IA, IB, IIA, IIB, IIC. Mientras tanto 23% de los individuos afectados se encontraba en estadios T3-T4 que abarcan la clasificación patológica IIIA, IIIB, IIIC y IV (Tabla 12).

La clasificación y descripción del TNM de los diferentes estadios en cáncer tipo melanoma se pueden observar en la Figura 5.

#### **3.4.1.4 Clasificación Breslow**

Desde las primeras investigaciones de cáncer tipo melanoma el coeficiente Breslow ha sido uno de los factores más importantes en el pronóstico de esta enfermedad que indica la profundidad en milímetros que ha alcanzado el tumor, en el presente estudio se encontró que 30% de pacientes afectados presentaba un valor de Breslow  $\leq 1$  mm, el 13% de casos un valor entre 1.01-2,00 mm, 21% de casos presentan un valor entre 2,01-4,00 y 36% de pacientes presenta un valor de Breslow de más de 4mm.

#### **3.4.1.5 Bordes quirúrgicos**

La presencia o no de bordes quirúrgicos se ha tomado como una variable pronostica, en el presente estudio se encontró que 23% de casos presenta positividad en bordes quirúrgicos y 77% de pacientes negatividad.

#### **3.4.1.6 Clasificación Clark**

La clasificación Clark define en que capa de la piel ha alcanzado la profundidad del melanoma (figura 4.) Aunque la clasificación Clark es proporcional a la de Breslow no es una variable continua por lo que muchos autores en la actualidad no la toman en cuenta.

Para la clasificación del melanoma sin embargo en este estudio se recopiló la información, obteniendo los datos que se indican en la Tabla 12, lo cual revela que el mayor porcentaje de casos (35%) se clasifican en Clark 4.

#### **3.4.1.7 Clasificación clínico-histológica del melanoma**

En cuanto a los subtipos más importantes del melanoma se encontró que en la población de casos estudiados, 4% de individuos presentaba el melanoma de extensión superficial, 45% el melanoma nodular, 30% melanoma lentigo maligno y 21% melanoma lentigo acral.

Se aplicó el test chi cuadrado ( $X^2$ ) para determinar asociación entre el tipo clínico-histológico del melanoma y las características patológicas antes mencionadas como lo describe la tabla 12, no se encontró asociación estadísticamente significativa con la edad, bordes quirúrgicos y los diferentes polimorfismos estudiados (rs1801133, rs1801131, rs1805087, rs1801394).



<b>POSITIVO</b>	0	0	7	15.56	11	36.67	5	23.81	23	23	0.123
<b>NEGATIVO</b>	4	100	38	84.44	19	63.33	16	76.19	77	77	
<b>CLARK</b>											
<b>I</b>	0	0	1	2.22	6	20.00	2	9.52	9	9	Reference
<b>II</b>	3	75	2	4.44	5	16.67	3	14.29	13	13	0.392
<b>III</b>	1	25	5	11.11	3	10.00	2	9.52	11	11	0.211
<b>IV</b>	0	0	17	37.78	4	13.33	11	52.38	32	32	0.003
<b>V</b>	0	0	20	44.44	12	40.00	3	14.29	35	35	0.045
<b>MTHFR C677T</b>											
<b>C/C</b>	1	25	10	22.22	11	36.67	2	9.52	24	24	Reference
<b>C/T</b>	2	50	29	64.44	13	43.33	14	66.67	58	58	0.131
<b>T/T</b>	1	25	6	13.33	6	20.00	5	23.81	18	18	0.398
<b>MTHFR A1298C</b>											
<b>A/A</b>	4	100	33	73.33	26	86.67	18	85.71	81	81	Reference
<b>A/C</b>	0	0	8	17.78	3	10.00	3	14.29	14	14	0.597
<b>C/C</b>	0	0	4	8.89	1	3.33	0	0.00	5	5	0.353
<b>MTR A2756G</b>											
<b>A/A</b>	3	75	42	93.33	24	80.00	17	80.95	86	86	Reference
<b>A/G</b>	1	25	3	6.67	4	13.33	3	14.29	11	11	0.526
<b>G/G</b>	0	0	0	0.00	2	6.67	1	4.76	3	3	0.344
<b>MTRR A66G</b>											
<b>A/A</b>	3	75	29	64.44	20	66.67	15	71.43	67	67	Reference
<b>A/G</b>	1	25	14	31.11	7	23.33	5	23.81	27	27	0.902
<b>G/G</b>	0	0	2	4.44	3	10.00	1	4.76	6	6	0.756

### 3.4.2 Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas

Para los 4 genes estudiados se encontró todas las variantes genotípicas esperadas es decir homocigotas de alelos normales o silvestres, heterocigotas y homocigotas de alelos mutantes, tanto para casos como para controles. Las frecuencias genotípicas y alélicas de los cuatro polimorfismos estudiados se presentan en la Tabla 13.

Las frecuencias genotípicas totales (Tabla 13) hacen posible determinar que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ). Los valores para cada polimorfismo fueron,  $P=0.6$ ,  $P=0.23$ ,  $P=0.07$ ,  $P=0.18$  respectivamente para cada gen (Tabla 13).

Tabla 13.

## Frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo estudiado.

GENES	Genotip o	FRECUENCIA GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALELICAS			P value HWE
		CASO S	CONTROLE S	TODO S	CASO S	CONTROLES S	TODO S	
MTHFR C677T	C/C	0.24	0.40	0.36	0.530	0.675	0.640	$\chi^2 = 0.06$
	C/T	0.58	0.56	0.56				$P > 0.05$
	T/T	0.18	0.05	0.08	0.470	0.325	0.360	
MTHFRA1298 C	A/A	0.81	0.98	0.94	0.880	0.987	0.960	$\chi^2 = 0.23$
	A/C	0.14	0.01	0.04				$P > 0.05$
	C/C	0.05	0.01	0.02	0.120	0.013	0.040	
MTRA2756G	A/A	0.86	0.75	0.78	0.915	0.857	0.872	$\chi^2 = 0.07$
	A/G	0.11	0.22	0.19				$P > 0.05$
	G/G	0.03	0.03	0.03	0.085	0.143	0.128	
MTRRA66G	A/A	0.67	0.03	0.19	0.805	0.474	0.556	$\chi^2 = 0.18$
	A/G	0.27	0.89	0.74				$P > 0.05$
	G/G	0.06	0.08	0.08	0.195	0.526	0.444	

Para determinar la asociación de los polimorfismos con el riesgo de presentar melanoma se aplicó la prueba chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y la prueba (OR) en un intervalo de confianza de 95%, efectuado en tablas de contingencia 2x2.

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 14, para el gen MTHFR y su variante C/T se observó un OR de 1.72 (CI: 95%=1.0 - 2.9;  $P=0.058$ ) para la variante T/T se obtuvo un OR de 6,48(2.8-14;  $P=0.00$ ), y sumadas las variantes CT+T/T un OR de 2.08 (1.24-3.48;  $P=0.01$ ).

Para el polimorfismo MTHFR A1298C se observó un OR de 12.92 (4.14-40.31;  $P=0.00$ ) en el genotipo heterocigoto A/C, para el genotipo homocigoto C/C se vio un OR de 9,22(1.75-48.4;  $P=0.01$ ) y para la suma de los dos A/C +C/C un OR de 11,68(4.52-30.22;  $P=0.00$ ). Para el polimorfismo MTRA2756G se obtuvo valores de OR=0.43 (0.22-0.86;  $P=0.02$ ) para el genotipo A/G, 0.80 (0.214-2.95;  $P=0.98$ ) para el genotipo G/G y 0,48(0.259-0.897;  $P=0.03$ ) para la suma de ambos A/G+G/G. Por último el polimorfismo MTRRA66G presentó valores de OR=0,01(0.006-0.030;  $P=0.00$ ) para el genotipo A/G, OR de 0,03(0.010-0.10;  $P=0.00$ ) para el genotipo G/G y 0,02(0.007-0.033;  $P=0.00$ ) para la suma de los dos AG+GG.

Tabla 14.

## Asociación entre cada polimorfismo y el riesgo de presentar melanoma.

GENES	Genotipo	Casos		Controles		TODOS		OR	95%CI	P
		n	n(%)	N	n(%)	N	n(%)			
<b>MTHFR C677T</b>	C/C	24.00	24.00	121.00	39.67	145.00	35.80		Reference	
	C/T	58.00	58.00	170.00	55.74	228.00	56.30	1.72	1.0 - 2.9	0.058
	T/T	18.00	18.00	14.00	4.59	32.00	7.90	6.48	2.8-14.7	0.00
	C/T+T/T	76.00	76.00	184.00	60.33	260.00	64.20	2.08	1.24-3.48	0.01
	N	100.00	100.00	305.00	100.00	405.00	100.00			
<b>MTHFR A1298C</b>	A/A	81.00	81.00	299.00	98.03	380.00	93.83		Reference	
	A/C	14.00	14.00	4.00	1.31	18.00	4.44	12.92	4.14-40.31	0.00
	C/C	5.00	5.00	2.00	0.66	7.00	1.73	9.22	1.75-48.4	0.01
	A/C+C/C	19.00	19.00	6.00	1.97	25.00	6.17	11.68	4.52-30.22	0.00
	N	100.00	100.00	305.00	100.00	405.00	100.00			
<b>MTR A2756G</b>	A/A	86.00	86.00	228.00	74.75	314.00	77.53		Reference	
	A/G	11.00	11.00	67.00	21.97	78.00	19.26	0.43	0.22-0.86	0.02
	G/G	3.00	3.00	10.00	3.28	13.00	3.21	0.80	0.214-2.95	0.98
	AG+GG	14.00	14.00	77.00	25.25	91.00	22.47	0.48	0.259-0.897	0.03
	N	100.00	100.00	305.00	100.00	405.00	100.00			
<b>MTRR A66G</b>	A/A	67.00	67.00	9.00	2.95	76.00	18.77		Reference	
	A/G	27.00	27.00	271.00	88.85	298.00	73.58	0.01	0.006-0.030	0.00
	G/G	6.00	6.00	25.00	8.20	31.00	7.65	0.03	0.010-0.10	0.00
	AG+GG	33.00	33.00	296.00	97.05	329.00	81.23	0.02	0.007-0.033	0.00
	N	100.00	100.00	305.00	100.00	405.00	100.00			

En el presente estudio también se realizó la prueba Odds Ratio entre los genotipos de los 4 genes y las características histopatológicas para ver si estadísticamente hay una asociación entre estas variables, sin embargo no se encontró relaciones significativas como se muestra en la Tabla 15.



**Tabla 15.**  
**Asociación de cada genotipo con características histopatológicas de**  
**pacientes.**

Variable	MTHFR C677T		MTHFR A1298C		MTR A2756G		MTRRA66G	
	C/C	C/T+T/T	A/A	A/C+C/C	A/A	A/G+G/G	A/A	A/G+G/G
Edad de diagnóstico								
<35	1(1%)	3(3%)	3(3%)	1(1%)	4(4%)	1(1%)	2(2%)	2(2%)
35-49	2(2%)	7(7%)	8(8%)	1(1%)	9(9%)	1(1%)	6(6%)	3(3%)
≥ 50	21(21%)	66(66%)	70(70%)	17(17%)	71(71%)	14(14%)	59(59%)	28(28%)
<b>Ora</b> <b>(95% CI)</b>	1.2 (0.1 - 18.3)		0.37(0.01-8.10)		0.44(0.022-9.032)		0.5(0.04-5.51)	
<b>P</b>	1		1		1		1	
<b>Orb</b> <b>(95% CI)</b>	1.04(0.10-10.61)		0.72(0.07-7.44)		0.789(0.082-7.597)		0.47(0.06-3.54)	
<b>P</b>	1		1		1		0.84	
Género								
<b>Femenino</b>	17(17%)	38(38%)	43(43%)	12(12%)	47(47%)	8(8%)	35(35%)	20(20%)
<b>Masculino</b>	7(7%)	38(38%)	38(38%)	7(7%)	39(39%)	6(6%)	32(32%)	13(13%)
<b>Or</b> <b>(95% CI)</b>	2.42(0.90-6.52)		0.66(0.23-1.84)		0.9(0.28-2.82)		0.71(0.30-1.65)	
<b>P</b>	0.12		0.59		1		0.56	
Localización								
<b>manos pies o cuero cabelludo</b>	11(11%)	43(43%)	44(44%)	10(10%)	47(47%)	7(7%)	35(35%)	19(19%)
<b>Extremida des extremidad cefálica</b>	4(4%)	9(9%)	9(9%)	4(4%)	10(10%)	3(3%)	9(9%)	4(4%)
<b>Tronco</b>	4(4%)	4(4%)	7(7%)	1(1%)	7(7%)	1(1%)	8(8%)	0
<b>Orc</b> <b>(95% CI)</b>	0.57(0.14-2.22)		1.95(0.5-7.64)		2.01(0.44-9.16)		0.81(0.22-3.01)	
<b>P</b>	0.66		0.55		0.62		1	
<b>Ord</b> <b>(95% CI)</b>	1.02(0.31-3.33)		0.83(0.23-2.98)		0.91(0.21-3.88)		1.22(0.46-3.25)	
<b>P</b>	1		1		1		0.87	
<b>Ore</b> <b>(95% CI)</b>	0.25(0.05-1.18)		0.62(0.06-5.70)		0.95(0.10-9.01)		0.814(0.706-0.939)	
<b>P</b>	0.16		1		1		0.109	
Clasificación patológica								
<b>T1-T2</b>	20(20%)	51(51%)	55(55%)	16(16%)	60(60%)	11(11%)	46(46%)	25(25%)
<b>T3-T4</b>	4(4%)	19(19%)	20(20%)	3(3%)	20(20%)	3(3%)	17(17%)	6(6%)
<b>Or</b> <b>(95% CI)</b>	1.86(0.56-6.15)		0.51(0.13-1.96)		0.81(0.20-3.23)		0.64(0.22-1.85)	

P	0.45	0.49	1	0.58				
BRESLOW								
≤1	8(8%)	22(22%)	27(27%)	3(3%)	27(27%)	3(3%)	20(20%)	10(10%)
<b>1.01-2.00</b>	2(2%)	11(11%)	9(9%)	4(4%)	9(9%)	4(4%)	8(8%)	5(5%)
<b>2.01-4.00</b>	3(3%)	18(18%)	17(17%)	4(4%)	18(18%)	3(3%)	15(15%)	6(6%)
<b>&gt;4.00</b>	11	25(25%)	28(28%)	8(8%)	32(32%)	4(4%)	24(24%)	12(12%)
<b>Orf (95% CI)</b>	2(0.36-11)		4(0.74-21.38)		4(0.74-21.38)		1.25(0.32-4.82)	
<b>P</b>	0.68		0.21		0.21		1	
<b>Org (95% CI)</b>	2.18(0.5-9.45)		2.11(0.42-10.65)		1.5(0.27-8.27)		0.8(0.23-2.69)	
<b>P</b>	0.47		0.61		0.97		0.95	
<b>Orh (95% CI)</b>	0.82(0.28-2.42)		2.57(0.61-10.72)		1.12(0.23-5.47)		1(0.35-2.79)	
<b>P</b>	0.94		0.32		1		1	
BORDES QUIRURGICOS								
<b>POSITIVO</b>	6(6%)	17(17%)	19(19%)	4(4%)	21(21%)	2(2%)	12(12%)	11(11%)
<b>NEGATIVO</b>	18(18%)	59(59%)	62(62%)	15(15%)	65(65%)	12(12%)	55(55%)	22(22%)
<b>Or (95% CI)</b>	1.15(0.39-3.37)		1.14(0.34-3.88)		1.93(0.40-9.37)		0.43(0.16-1.13)	
<b>P</b>	1		1		0.62		0.14	
CLARK								
<b>I</b>	2(2%)	7(7%)	8(8%)	1(1%)	9(9%)	0	5(5%)	4(4%)
<b>II</b>	3(3%)	10(10%)	11(11%)	2(2%)	10(10%)	3(3%)	9(9%)	4(4%)
<b>III</b>	3(3%)	8(8%)	8(8%)	3(3%)	9(9%)	2(2%)	6(6%)	5(5%)
<b>IV</b>	6(6%)	26(26%)	25(25%)	7(7%)	29(29%)	3(3%)	23(23%)	9(9%)
<b>V</b>	10(10%)	25(25%)	29(29%)	6(6%)	29(29%)	6(6%)	24(24%)	11(11%)
<b>Ori (95% CI)</b>	0.95(0.12-7.27)		1.45(0.11-18.95)		1.3(0.96-1.75)		0.55(0.09-3.24)	
<b>P</b>	1		1		0.35		0.83	
<b>Orj (95% CI)</b>	0.76(0.09-5.95)		3(0.25-35.33)		1.22(0.92-1.61)		1.04(0.17-6.12)	
<b>P</b>	1		0.73		0.54		1	
<b>Ork (95% CI)</b>	1.23(0.20-7.52)		2.24(0.23-21.07)		1.10(0.98-1.23)		0.48(0.1-2.24)	
<b>P</b>	1		0.8		0.34		0.6	
<b>Orl (95% CI)</b>	0.71(0.12-4)		1.65(0.17-15.81)		1.2(1-1.4)		0.57(0.12-2.55)	
<b>P</b>	1		1		0.42		0.73	

## CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN

En Ecuador y el resto del mundo la incidencia del melanoma ha crecido vertiginosamente en los últimos 20 años. El melanoma maligno es una de las neoplasias cutáneas más peligrosas y agresivas, constituye el 4% de todos los casos de cáncer de piel sin embargo es responsable del 70 a 80% de las muertes de este tipo de cáncer. El estudio en esta enfermedad es de gran relevancia ya que es un tumor de rápido crecimiento y para el cual no existe un tratamiento efectivo por su difícil diagnóstico en sus etapas tempranas. Por lo que se busca caracterizar la enfermedad a nivel genético utilizando marcadores moleculares que nos permitan predecir el curso de la enfermedad (Cueva & Yépez, 2014).

Aunque las tasas de incidencia y mortalidad del melanoma son bajas en Ecuador comparadas con otros países como Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, es necesario recopilar información sobre la distribución y frecuencia de diferentes polimorfismos que se pueden asociar a la susceptibilidad de presentar la enfermedad. Así mismo recopilar información que brinden los historiales clínicos como: edad, género, clasificación patológica, entre otras, nos permitirán conocer de mejor manera el desarrollo de la enfermedad en población ecuatoriana y poder comparar la susceptibilidad de presentar la enfermedad con otras etnias, y así proponer soluciones para un diagnóstico rápido, temprano y accesible para frenar el desarrollo de este tipo de cáncer (Botella & Sanmartín, 2010; Cueva & Yépez, 2014; Espinoza & Poveda, 2003).

Aunque el actual estudio se base en determinar frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos en genes que intervienen en el metabolismo del ácido fólico, también es necesario discutir información recopilada de las historias clínicas de los pacientes, ya que esta ayudará a determinar si hay asociación entre la presencia de las variantes genéticas, con características histopatológicas de los pacientes y a su vez brindará conclusiones importantes del melanoma en población ecuatoriana.

La información recopilada de las historias clínicas como frecuencia de edades y género, tipo de melanoma, localización anatómica del melanoma, clasificación patológica, clasificación Breslow, bordes quirúrgicos, clasificación Clark se discute a continuación.

En este estudio se encontró que la frecuencia de edades y género tienen distribuciones que contrastan con lo que ocurre a nivel mundial. Según el National cancer institute (2016) en personas menores a 45 años la incidencia es mayor en mujeres, así mismo esta entidad afirma que a partir de los 60 años la incidencia del melanoma en hombres duplica a la incidencia en mujeres y a partir de los 80 años los hombres tienen una probabilidad casi tres veces mayor de presentar melanoma, sin embargo este estudio difiere en esos datos, en el rango de edades de 35-49 años se encontró un 6.7% de hombres diagnosticados con melanoma y 10.9% de mujeres diagnosticadas con melanoma, y en personas de >50 años los porcentajes fueron similares con 86.7% diagnósticos en hombres y 87.3% diagnósticos en mujeres.

Según la OMS (2016) a nivel mundial aproximadamente 49% de casos de melanoma se presentan en hombres y 51% en mujeres, estos datos son similares a los obtenidos ya que se encontró un total de 55% de mujeres afectadas y 45% de hombres afectados.

En cuanto a los subtipos más importantes del melanoma se determinó que en la población estudiada, 4% de individuos presentaban melanoma de extensión superficial, 45% el melanoma nodular, 30% melanoma lentigo maligno y 21% melanoma lentigo acral. Este porcentaje difiere de estudios realizados por Garbe and Leiter (2009) en población europea que indica que el subtipo más frecuente es melanoma de extensión superficial (59%), le sigue melanoma nodular (21%), lentigo maligno con 11% y melanoma lentigo acral con 4%(Garbe & Leiter, 2009).

Se aplicó el test chi cuadrado ( $X^2$ ) para determinar asociación entre el tipo clínico-histológico del melanoma y las características patológicas antes mencionadas como lo describe la Tabla 12, no se encontró asociación estadísticamente significativa con la edad, bordes quirúrgicos y los diferentes polimorfismos estudiados (rs1801133,rs1801131,rs1805087,rs1801394), sin

embargo se encontró relación significativa para localización anatómica ( $P=0.000$ ), Clasificación patológica ( $P=.006$ ), Breslow  $>4\text{mm}$  ( $0.000$ ) y coeficientes de CLARK más altos ( $IV=0.003;V=0.045$ ).

Aunque no hay bibliografía de referencia para comparar estos resultados, se puede concluir que existe relación significativa entre el subtipo clínico del melanoma y el estadiaje de la enfermedad. Esto puede significar una ventaja ya que información del subtipo de melanoma también puede ser una variable pronóstica de la enfermedad (Gerami *et al.*, 2015).

En cuanto a la relación entre los genotipos de los 4 genes y las características histopatológicas no se encontró relaciones significativas, como se muestra en la Tabla 15, por lo que estas variables patológicas no tienen alguna relación o influencia en el metabolismo del folato.

Como se ha visto factores ambientales o propios de una persona pueden favorecer al desarrollo de melanoma sin embargo este estudio se enfoca en como mutaciones polimórficas pueden influir a que se desarrolle la enfermedad. Por lo que se ha tomado en cuenta genes relevantes en salud humana, como lo son genes involucrados en la ruta metabólica de ácido fólico y de la metionina. Las enzimas y sus respectivos genes más relevantes en las rutas previamente mencionadas son, la enzima metionina sintasa reductasa (por sus siglas en inglés MSR) es codificada por el gen MTRR, la enzima metionina sintasa (MS) es codificada por el gen MTR y la metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), es codificada por el gen que lleva su nombre (MTHFR) (Nazki, Sameer, & Ganaie, 2014).

Estas 4 enzimas están relacionadas con la síntesis de nucleótidos, metilación del ADN, y la reparación del mismo. En los genes que codifican dichas enzimas se han identificado polimorfismos de nucleótido simple (SNP) que provocan mutaciones no sinónimas es decir se genera un cambio de un aminoácido por otro (MTHFRC677T (A222V), MTHFRA1298C(E429A), MTRA2756G(D919G) y MTRR A66G(I22M)), este cambio está relacionado con la disminución de actividad enzimática y aumento de termolabilidad, generando deficiencias de folato y elevando homocisteína (hiperhomocisteinemia) en plasma, estos desordenes metabólicos provocan

alteraciones en la metilación de ADN y eventualmente carcinogénesis (Izmirli, 2013).

Los polimorfismos estudiados MTHFRC677T, MTHFRA1298C, MTRA2756G y MTRR A66G han sido relacionados con diferentes enfermedades como síndrome de Down, defectos de tubo neural, enfermedades coronarias, enfermedades cerebro vasculares, entre otras, así mismo a otros tipos de cáncer como leucemias, linfomas, cáncer colon rectal, cáncer de mama, etc. Este es el primer estudio que analiza estos cuatro SNP en población Ecuatoriana y latinoamericana, referida a cáncer de piel tipo melanoma. Los tres genes estudiados (MTHFR, MTR y MTRR) interactúan entre sí, en el metabolismo del folato y de la metionina (Nazki *et al.*, 2014).

Como se observa en la figura 6 La MTHFR cataliza la reducción de 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-metilen THF) en 5-metiltetrahidrofolato (5-metilen THF). El 5-metilen THF actúa como coenzima, donando el grupo metilo a la enzima MS la misma que cataliza la conversión homocisteina-metionina. La remetilación de homocisteina a metionina es catalizada por MS en una reacción dependiente de vitamina B12, como el portador del grupo metilo. La enzima MS se vuelve inactiva cuando el cofactor de la remetilación (vitamina B12) es oxidada por la enzima MSR usando a SAM como donador del grupo metilo. MTR también está encargada de la regeneración de THF de tal manera que una disminución de 5,10-metilen THF puede comprometer la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP) por la enzima timidilato sintasa (TS), causando una acumulación de uracilo y una reducción de timina. Esto podría entonces llevar a una incorporación errónea en el ADN durante la replicación o reparación ocasionando daño al ADN, incluyendo mutaciones puntuales y roturas de la cadena (Lopez-Cortes *et al.*, 2013).

En esta investigación se logró detectar la presencia de los 4 polimorfismos estudiados tanto en las muestras de los pacientes con melanoma como en los controles, por lo que se determinó las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos y a través de un análisis estadístico

ODDS Ratio se pudo determinar si la presencia de los polimorfismos es un riesgo determinante para adquirir melanoma.

Los resultados obtenidos en este estudio indican una asociación estadística significativa entre la presencia de los polimorfismos MTHFR C677T y MTHFR 1298 en genes del ciclo del folato y metionina y la susceptibilidad de presentar cáncer de piel tipo melanoma. En esta investigación se encontró que los genotipos MTHFR C677T T/T Y C/T+ T/T indican alto riesgo de presentar melanoma con un OR 6.48( P=0.00) y 2.08(P=0.01) respectivamente, al igual que las variantes MTHFR 1298(A/C;C/C;A/C+C/C) con un OR 12.92(P=0.00),9.22(P=0.01),11.68(P=0.00) respectivamente.

El polimorfismo MTHFR C677T ha sido el más estudiado con relación al metabolismo del ácido fólico, se ha visto que en mujeres embarazadas que presentan defectos de tubo neural (DTN) con genotipo T/T y C/T mostraban concentraciones significativamente bajas de folato en plasma comparado con mujeres embarazadas sanas que presentaban genotipo 677C/C (Izmirli, 2013).

En otras enfermedades como síndrome de Down, enfermedades cardiovasculares, malformaciones congénitas y deterioro cognitivo, estos genotipos (677T/T y 677C/T) son factores de riesgo comprobados. MTHFR A1298C también se relaciona con las enfermedades antes mencionadas, pero no ha sido tan explorado como 677 C/T, sin embargo queda claro que 1298 A/C también provoca disminución de la actividad enzimática y aumenta la termolabilidad de la enzima (Shrubsole *et al.*, 2006).

En cuanto a la relación de los polimorfismos y cáncer en población ecuatoriana se han realizado dos estudios previos con genes del folato en cáncer de mama y próstata. En próstata el genotipo MTHFR677 C/T representa riesgo significativo de contraer esta enfermedad con un OR de 2.2 (P=0.008) de igual manera para cáncer de mama los genotipos asociados al riesgo de la enfermedad fueron MTHFR677 C/T, MTHFR677 T/T y MTHFR677 C/T + T/T, en estos dos estudios no se encontró asociación

estadística con respecto a los otros polimorfismos, estudiados MTHFRA1298C MTR A27556G y MTRR A66G (Lopez-Cortes *et al.*, 2015).

En cuanto a cáncer de piel se han encontrado estudios realizados por Lesiak *et al.* (2011) en población de Europa Oriental que indica que el genotipo MTHFR677C/T y MTHFR1298 (A/C y C/C), está asociado estadísticamente con la presencia de carcinoma baso celular, otro tipo de cáncer de piel menos mortal. Un meta análisis realizado por Deng, Gao, L, and Gao (2014) que reúne información de diferentes investigaciones de poblaciones Norte Americanas, Suecas, Irlandesas, Coreanas y Polacas en cuanto a cáncer de piel (todos los tipos) concluye que el genotipo MTHFR 1298 C/C influye en la presencia de cáncer de piel, sin embargo la variante MTHFRC677T no presenta ninguna relación significativa.

La contraparte presenta un estudio realizado por Han, Colditz, and Hunter (2007) , en población Norte americana, donde estudia los tres principales tipos de cáncer de piel (Melanoma, escamo celular carcinoma y carcinoma baso celular) y su relación con los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C , sin embargo no encontró asociación de riesgo con ningún genotipo. No obstante se encontró que mujeres que presentaban carcinoma baso celular y el polimorfismo MTHFR 677T/T presentaban disminución de folato en sangre (Lesiak *et al.*, 2011).

Por otro lado los genes MTR y MTRR no han sido estudiados previamente en población ecuatoriana o latinoamericana que presente melanoma, por lo que no se puede tener una referencia. Son variadas las opiniones y resultados respecto a estos genes y su influencia en diferentes tipos de cáncer. El polimorfismo MTR A2756G se ha asociado con la reducción del riesgo en cáncer colon rectal y leucemia linfoblástica aguda, pero aumenta el riesgo en linfoma maligno y no está asociado a la presencia de linfoma no-Hodgkins y cáncer uterino. MTRR A66G se asocia con aumentar el riesgo en cáncer colon rectal hasta tres veces en población Japonesa, pero no presenta asociación con leucemia linfoblastica aguda, linfoma no Hodgkins o cáncer gástrico (Rady *et al.*, 2002; Shrubsole *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2013).



En estudios casos controles el valor de OR menor a la unidad indica que las variables estudiadas no tienen una asociación positiva con la mayor recurrencia de la enfermedad, al contrario indican que dicha variable funciona como un factor protector de la enfermedad (Cerdeira, Vera, & Rada, 2013).

Los valores de OR para la presencia de al menos una variante alélica rara de los polimorfismos MTR A2756G y MTRR A66G fueron 0.48 ( $P=0.03$ ) y 0.02 ( $P=0.00$ ) respectivamente. Lo que indica que la presencia de estos alelos generan menor riesgo de presentar melanoma, sin embargo tomando en cuenta que en estudios previos en diferentes poblaciones se ha demostrado que los polimorfismos MTR A2756G y MTRR A66G causan aumento en la actividad enzimática en el caso de la enzima MTRR y disminución de actividad enzimática en MTRR respectivamente, provocando elevación considerable de homocisteína en plasma y a su vez generando el desarrollo de múltiples enfermedades, por lo que no se puede considerar que el aumento de homocisteína en plasma sea un factor de protección para el melanoma (Coppedè *et al.*, 2014; Mitchell, Conus, & Kaput, 2014).

Basándose en esta evidencia no es posible denominar como “favorable” o “desfavorable” a un genotipo o alelo de los SNP'S MTR A2756G y MTRR A66G ya que estas dos variantes tienen un comportamiento diferente entre distintas enfermedades y poblaciones. Por lo que se sugiere que los cambios que generan los polimorfismos y su relación con otros genes son más complejas de lo estudiado y por otra parte se necesita un mayor número de muestra tanto de casos como controles para tener resultados estadísticos más confiables.

En Ecuador el melanoma es una patología de alta incidencia sobre todo en población de la sierra debido a la posición geográfica más cercana a la línea ecuatorial donde los rayos uv inciden de manera directa. La radiación uv puede afectar a las moléculas de folato promoviendo su ruptura y provocando una disminución considerable en plasma sanguíneo, aunque este fenómeno ha sido estudiado ampliamente en plasma, es necesario investigar cómo afecta la radiación uv la cantidad de folato en células epiteliales. Sumando la predisposición genética y exposición intermitente a radiación uv, se da un

ambiente idóneo para que la enfermedad progrese (Bastidas & Guaman, 2013; Han *et al.*, 2007).

Aunque en este estudio caso control la información de las historias clínicas es limitada en cuanto a datos de consumo de folato en la dieta de pacientes o niveles de folato en suero, la información genotípica de los genes MTHFR, MTR y MTRR nos dan información importante de la relación de los polimorfismos con la presencia de melanoma. Otros datos de factores ambientales a los que se exponían los individuos como exposición a radiación UV, quemaduras previas, tipo de piel y presencia de nevus podrían ser de gran ayuda para establecer el papel de la radiación UV en la presencia de melanoma en la población ecuatoriana.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Los protocolos de extracción de ADN utilizados tanto para muestras de casos como para muestras control permitieron obtener la concentración de ADN adecuada para amplificar los fragmentos requeridos.

La técnica de secuenciación Sanger permitió detectar los tres posibles alelos para los cuatro polimorfismos estudiados en población ecuatoriana, tanto en muestras de pacientes con melanoma como muestras de personas sanas.

Las pruebas estadísticas chi cuadrado ( $X^2$ ) y odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%, permitieron correlacionar estadísticamente las frecuencias de polimorfismos entre muestras casos con muestras control y determinaron que la presencia de los polimorfismos de nucleótido simple estudiados rs1801133 y rs1801131 tienen un efecto significativo en la susceptibilidad de presentar cáncer de piel tipo melanoma.

La prueba estadística chi cuadrado ( $X^2$ ) demostró una relación significativa entre el subtipo de melanoma y diferentes características patológicas como: la localización anatómica, clasificación patológica, nivel de Breslow y coeficientes de Clark. Sin embargo no se encontró relaciones significativas entre variables patológicas y los diferentes polimorfismos.

La información de historias clínicas de los pacientes con melanoma estudiados brindó datos relevantes sobre la enfermedad en dicha población, entre esos se encontró que el subtipo de melanoma más común es melanoma nodular con 45%, así mismo la distribución en cuanto al género de la enfermedad indica un porcentaje ligeramente mayor de mujeres (55%) en relación a los hombres (45%). El 36% de personas afectadas presenta nivel de Breslow  $>4.00\text{mm}$ , lo que indica una progresión avanzada de la enfermedad y pobre diagnóstico. El 23% de pacientes presenta clasificación patológica T3-T4 que indica peor pronóstico y menor expectativa de vida.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Realizar estudios de ancestrías genéticas en población afectada con melanoma para caracterizar la composición étnica y evidenciar a que etnia afecta en mayor porcentaje la enfermedad en Ecuador.

Analizar la relación entre la presencia de los polimorfismos estudiados y cambios a nivel de expresión genética de los genes del metabolismo del folato.

Aumentar el tamaño de muestras de casos como muestras controles para evidenciar resultados estadísticos más robustos.

Se recomienda incluir información de: exposición al sol, tipo de piel, quemaduras previas, presencia de nevus, en historiales clínicos de pacientes que tengan enfermedades relacionadas a la piel como melanoma, ya que es de vital importancia para establecer el curso de la enfermedad.

En estudios relacionados al metabolismo de los folatos se recomienda incluir información sobre concentración de ácido fólico en plasma y niveles de ácido fólico en la dieta (como vitamina B), para establecer relaciones consistentes entre cantidades consumidas y susceptibilidad a enfermedades. Así mismo se recomienda realizar estudios de concentración de folato en células epiteliales, ya que se ha visto que la radiación UV afecta a esta molécula y la piel tiene exposición directa a la luz solar.

Para amplificar ADN de muestras de tejido embebidas en parafina se recomienda que el amplicon generado no sobrepase las 350 pb. Así mismo es recomendable que las muestras no sobrepasen 2 o 3 años de conservación para su estudio, el ADN puede degradarse dificultando la obtención de amplificadores de interés.

En estudios caso control se recomienda que el origen de las muestras tanto de casos como de controles sea el mismo.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A. E., Fierro, E., Velásquez, V., & Rueda, X. (2009). Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología. *Rev Asoc Col Dermatol*, 17(2), 87-108.
- American Cancer Society. (2016). Factores de riesgo del cancer de piel tipo melanoma. Recuperado de [http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepieltipomelanoma/guia\\_detalle/cancer-de-piel-tipo-melanoma-causes-risk-factors](http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepieltipomelanoma/guia_detalle/cancer-de-piel-tipo-melanoma-causes-risk-factors)
- Applied Biosystems. (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis (Segunda ed., Vol. Segunda edicion).
- Avilés, J. A., & Lázaro, P. (2006). Predisposición genética en el melanoma cutáneo. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 97(4), 229-240.
- Avilés, J. A., Lázaro, P., & Lecona, M. (2006). Epidemiología y supervivencia del melanoma cutáneo en España: estudio de 552 casos (1994-2003). *Revista Clínica Española*, 206(7), 319-325. doi:<http://dx.doi.org/10.1157/13090479>
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., . . . Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27(36), 6199-6206. doi:10.1200/jco.2009.23.4799
- Bastidas, L., & Guaman, J. (2013). *Características Socio-Epidemiológicas del melanoma en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca durante el periodo 2000-2008*. (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Beckman Coulter. (2016). AGENCOURT® AMPURE® XP PCR purification protocol. Recuperado de [https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol\\_000387v001.pdf](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol_000387v001.pdf)
- Bolívar Sánchez, A. M., Rojas E., A. d. V., & García Lugo, P. J. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances*

- en *Biomedicina*, 3(1), 9. Recuperado de <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/biomedicina/article/view/4584>
- Botella, R., & Sanmartín, O. (2010). Diferentes alteraciones genéticas causan diferentes melanomas y nuevas posibilidades terapéuticas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 101(5), 394-400. doi:10.1016/j.ad.2010.01.003
- Cerda, J., Vera, C., & Rada, G. (2013). Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. *Revista médica de Chile*, 141, 1329-1335. Recuperado de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872013001000014&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872013001000014&nrm=iso)
- Coppedè, F., Bosco, P., Lorenzoni, V., Denaro, M., Anello, G., Antonucci, I., . . . Migliore, L. (2014). The MTRR 66A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome in Caucasian women: a case-control study and a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 41(9), 5571-5583. doi:10.1007/s11033-014-3462-5
- Cueva, P., & Yépez, J. (Eds.). (2014). *Epidemiología del cáncer en Quito 2006-2010* (15 ed.). Quito, Ecuador.
- Checa, M. (2007). Polimorfismos genéticos importancia y aplicaciones. *REV INST NAL ENF RESP MEX*, 20(3), 213-221.
- De Marco, P., Calevo, G., Moroni, A., Arata, L., Merello, E., Cama, A., . . . Capra, V. (2001). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg*, 11 Suppl 1, S14-17. doi:10.1055/s-2001-19739
- Deng, F., Gao, Y., L, V. J., & Gao, J. M. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and skin cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Genet*, 207(7-8), 299-305. doi:10.1016/j.cancergen.2014.08.001
- Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E. E., Jung, M., Meller, S., & Kristiansen, G. (2013). Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. *PLoS ONE*, 8(10), e77771. doi:10.1371/journal.pone.0077771

- Dummer, R., Hauschild, A., Lindenblatt, N., Pentheroudakis, G., & Keilholz, U. (2015). Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 26(suppl\_5), v126-v132. doi:10.1093/annonc/mdv297
- Duncan, L. M. (2009). The Classification of Cutaneous Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(3), 501-513. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2009.03.013>
- Eggermont, A. M. M., Spatz, A., & Robert, C. (2014). Cutaneous melanoma. *The Lancet*, 383(9919), 816-827. doi:10.1016/S0140-6736(13)60802-8
- Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schüz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E. W., & Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk? *International Journal of Cancer*, 132(2), 385-400. doi:10.1002/ijc.27616
- Espinoza, G., & Poveda, M. (2003). Actualización en Melanoma Incidencia, desarrollo Aspectos Biológicos y Reporte de casos clínicos. *Revista Oncológica Solca*, 13(1-2), 89-97.
- Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2001). Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy *Current Protocols in Human Genetics*: John Wiley & Sons, Inc.
- Garbe, C., & Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*, 27(1), 3-9. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.09.001
- Gerami, P., Cook, R. W., Wilkinson, J., Russell, M. C., Dhillon, N., Amaria, R. N., . . . Stone, J. F. (2015). Development of a Prognostic Genetic Signature to Predict the Metastatic Risk Associated with Cutaneous Melanoma. *Clinical Cancer Research*, 21(1), 175-183. doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-3316
- González, V. (2010). Genes de predisposición al melanoma. Melanoma familiar. *Educación Médica Continua*, XVI(4), 327-335.

- Han, J., Colditz, G. A., & Hunter, D. J. (2007). Polymorphisms in the MTHFR and VDR genes and skin cancer risk. *Carcinogenesis*, *28*(2), 390-397. doi:10.1093/carcin/bgl156
- Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., . . . Kumar, R. (2013). *TERT* Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science*, *339*(6122), 959-961. doi:10.1126/science.1230062
- Huang, F. W., Hodis, E., Xu, M. J., Kryukov, G. V., Chin, L., & Garraway, L. A. (2013). Highly Recurrent *TERT* Promoter Mutations in Human Melanoma. *Science*, *339*(6122), 957-959. doi:10.1126/science.1229259
- Invitrogen. (2014). Pure Link Genomic DNA Kits Users Guide.
- Izmirli, M. (2013). A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Molecular Biology Reports*, *40*(1), 625-637. doi:10.1007/s11033-012-2101-2
- Josep, C., Martí, R., & Manuel, B. (2005). Estadificación y pronóstico del melanoma. *Servicio de Dermatología Universidad Arnau de Vilanova*, *20*(3), 133-140.
- Karger, B. L., & Guttman, A. (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*, *30*(Suppl 1), S196-S202. doi:10.1002/elps.200900218
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics*, *8*(1), 37. doi:10.1186/s12920-015-0115-z
- Kong, Y., Kumar, S. M., & Xu, X. (2010). Molecular Pathogenesis of Sporadic Melanoma and Melanoma-Initiating Cells. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *134*(12), 1740-1749. doi:10.1043/2009-0418-RAR.1
- kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., & Aster, J. (2010). *Patología estructural y funcional* (ELSEIVER Ed.). Barcelona-España.
- Lee, J. (1993). *Epidemiología de los cánceres de piel* (E. M. Panamericana Ed.). Buenos Aires - Argentina.



- Leiter, U., Eigentler, T., & Garbe, C. (2014). Epidemiology of Skin Cancer *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer* (pp. 120-140). New York, NY: Springer New York.
- Lesiak, A., Norval, M., Wodz-Naskiewicz, K., Pawliczak, R., Rogowski-Tylman, M., Sysa-Jedrzejowska, A., . . . Narbutt, J. (2011). An enhanced risk of basal cell carcinoma is associated with particular polymorphisms in the VDR and MTHFR genes. *Exp Dermatol*, *20*(10), 800-804. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01328.x
- Liu, Y., & Sheikh, M. S. (2014). Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Molecular and cellular pharmacology*, *6*(3), 228. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346328/>
- Lopez-Cortes, A., Echeverria, C., Ona-Cisneros, F., Sanchez, M. E., Herrera, C., Cabrera-Andrade, A., . . . Paz, Y. M. C. (2015). Breast cancer risk associated with gene expression and genotype polymorphisms of the folate-metabolizing MTHFR gene: a case-control study in a high altitude Ecuadorian mestizo population. *Tumour Biol*, *36*(8), 6451-6461. doi:10.1007/s13277-015-3335-0
- Lopez-Cortes, A., Jaramillo-Koupermann, G., Munoz, M. J., Cabrera, A., Echeverria, C., Rosales, F., . . . Paz-y-Mino, C. (2013). Genetic polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the Ecuadorian population. *Am J Med Sci*, *346*(6), 447-454. doi:10.1097/MAJ.0b013e3182882578
- Mitchell, E. S., Conus, N., & Kaput, J. (2014). B vitamin polymorphisms and behavior: Evidence of associations with neurodevelopment, depression, schizophrenia, bipolar disorder and cognitive decline. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *47*, 307-320. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.006>
- Mukherji, B. (2013). Immunology of melanoma. *Clin Dermatol*, *31*(2), 156-165. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.08.017>

- Nagore, E., Botella-Estrada, R., Requena, C., Serra-Guillén, C., Martorell, A., Hueso, L., . . . Guillén, C. (2009). Perfil clínico y epidemiológico de los pacientes con melanoma cutáneo según el grado de exposición solar de la localización del melanoma. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 100(3), 205-211. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0001-7310\(09\)70536-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-7310(09)70536-8)
- National cancer institute. (2016). Generalidad del Melanoma. Recuperado de <http://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq>
- Nazki, F. H., Sameer, A. S., & Ganaie, B. A. (2014). Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, 533(1), 11-20. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.063>
- Oliveros, C., Bravo, J. C., Zambrano, A., Cepeda, M., & Ramirez, A. F. (2012). Tendencia de la incidencia y mortalidad en melanoma maligno en los últimos 60 años y análisis de los datos del Registro Poblacional de Cáncer en Cali. *Rev Asoc Col Dermatol*, 20(3), 255-264.
- OMS. (2016). Skin cancers. WHO. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr35/es/>
- Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222. Recuperado de <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/6/12222>
- Osian, G., Procopciuc, L., & Vlad, L. (2007). MTHFR polymorphisms as prognostic factors in sporadic colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis*, 16(3), 251-256.
- Pasquali, E., García-Borrón, J. C., Fagnoli, M. C., Gandini, S., Maisonneuve, P., Bagnardi, V., . . . for the, M. S. S. G. (2015). MC1R variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: A pooled-analysis from the M-SKIP project. *International Journal of Cancer*, 136(3), 618-631. doi:10.1002/ijc.29018
- Promega. (2015). Resolution of linear DNA on agarose gels. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/what-percentage-agarose-is-needed-to-sufficiently-resolve-my-dna-sample/>

- Puig, S., Aguilera, P., & Badenas, C. (2006). *Asesoramiento genético del melanoma*. Recuperado de [http://www.geneticaycancer.es/web/pdf/guias\\_manejo/melanoma.pdf](http://www.geneticaycancer.es/web/pdf/guias_manejo/melanoma.pdf)
- Rady, P. L., Szucs, S., Grady, J., Hudnall, S. D., Kellner, L. H., Nitowsky, H., . . . Matalon, R. K. (2002). Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *American Journal of Medical Genetics*, *107*(2), 162-168. doi:10.1002/ajmg.10122
- Ramirez, J., Vargas, G., Tovilla, C., & Fragoso, J. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rsNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*, *149*, 220-228.
- Restrepo, C., & Velásquez, M. (2012). Mecanismos de patogénesis del melanoma maligno. *Rev Asoc Col Dermatol*, *20*(2), 161-172.
- Ríos, L., Nagore, E., López, J. L., Redondo, P., Martí, R. M., Fernández-de-Misa, R., & Soler, B. (2013). Registro nacional de melanoma cutáneo. Características del tumor en el momento del diagnóstico: 15 años de experiencia. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, *104*(9), 789-799. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2013.02.003>
- Shitara, D., Tell-Martí, G., Badenas, C., Enokihara, M. M. S. S., Alós, L., Larque, A. B., . . . Bagatin, E. (2015). Mutational status of naevus-associated melanomas. *British Journal of Dermatology*, *173*(3), 671-680. doi:10.1111/bjd.13829
- Shrubsole, M. J., Gao, Y.-T., Cai, Q., Shu, X. O., Dai, Q., Jin, F., & Zheng, W. (2006). *MTR* and *MTRR* Polymorphisms, Dietary Intake, and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *15*(3), 586-588. doi:10.1158/1055-9965.epi-05-0576
- Tamay, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, *2*(2), 70-78.

- Wang, S.-s., Qiao, F.-y., Feng, L., & Lv, J.-j. (2008). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(2), 93-99. doi:10.1631/jzus.B0710599
- Yang, B., Liu, Y., Li, Y., Fan, S., Zhi, X., Lu, X., . . . Sun, G. (2013). Geographical Distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in China: Findings from 15357 Adults of Han Nationality. *PLoS ONE*, 8(3), e57917. doi:10.1371/journal.pone.0057917