



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA UNR EN MUESTRAS
DE MELANOMA DE INDIVIDUOS ECUATORIANOS

AUTORAS

Gisella Carolina Landázuri Yacelga
Dóminick Melissa Ordóñez Vásquez

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA UNR EN MUESTRAS DE
MELANOMA DE INDIVIDUOS ECUATORIANOS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología

Profesora guía

Ph.D. Alina Aguirre Quevedo

Autoras

Gissella Carolina Landázuri Yacelga

Dóminick Melissa Ordóñez Vásquez

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con las estudiantes, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alina Aguirre Quevedo
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756594600

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de titulación”.

Carlos Andrés Bastidas Caldés
Máster en Microbiología Ambiental
CI: 0201619806

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alejandro Cabrera

Máster en Biología Molecular, Bioquímica y Biomedicina

CI: 1715463733

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LAS ESTUDIANTES

Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Gisella Carolina Landázuri Yacelga

CI: 1003176300

Dominick Melissa Ordóñez Vásquez

CI: 1723423982

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros padres por apoyarnos incondicionalmente en todas las metas que nos hemos propuesto. A nuestras familias y amigos, por ser un apoyo fundamental. A Alejandro Cabrera, por tantos conocimientos impartidos, y finalmente pero no menos importante, a Dios.

DEDICATORIA

A mis padres, gracias por siempre creer en mí e impulsarme a seguir cumpliendo todas mis metas.

A mis hermanos, mis más grandes tesoros, gracias por su compañía, apoyo y cariño incondicional.

A mi abuelita Ange, sin duda fue una mujer extraordinaria que me enseñó a luchar por mis sueños.

A mis tías Xime y Yoli que, con su ejemplo y cariño incondicional, me alentaron a culminar esta etapa de mi vida.

A mi mejor amiga Val por ser incondicional en mi vida.

A mis amigos de la universidad Nathy, Ale, Domi, Fredy y Jorge; gracias por compartir estos años conmigo.

A mi Roberto por su amor, comprensión y apoyo brindado.

A todos los llevo en lo más profundo de mi corazón.

DEDICATORIA

A mi madre, que con su ejemplo me ha enseñado a luchar cada día por mis sueños, y con su apoyo incondicional me ha dado la fuerza para nunca desfallecer.

A mis hermanos Sami y Xavy, que siempre han sido mi motor para cumplir cada una de mis metas.

A mi ñaño Andy, que ha sido como un padre para mí, por enseñarme tantas cosas y por cuidarme como lo hace.

A mis amigas y amigos Heather, Vane, Gis, Wen, Naty, David, Fredy y Nico, que siempre han estado para mí.

A Ri, quien con paciencia y amor, me ha acompañado en esta larga pero hermosa trayectoria que ha sido la vida estudiantil.

Para todos ellos, que los tengo siempre presentes y los llevaré por siempre en mi corazón.

RESUMEN

El cáncer es considerado una de las patologías con mayor índice de mortalidad y morbilidad en el mundo. El diagnóstico suele realizarse en etapas tardías aumentando así la tasa de mortalidad. El melanoma es el tipo de cáncer de piel más agresivo y mortal, con 132 000 casos nuevos diagnosticados y 66 000 fallecimientos anuales. Por otro lado, investigaciones actuales, han demostrado que las proteínas de unión al ARN (RBPs) tienen un rol importante en la modulación de genes específicos que inciden sobre el inicio, desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer. Aunque no se conoce con claridad el mecanismo molecular mediante el cual estas proteínas actúan, resultados a partir de experimentos *ex vivo* y en modelos xenográficos sugieren que la proteína RBP UNR induce iniciación y metástasis en melanoma. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión UNR en muestras de melanoma de individuos ecuatorianos y asociar esta expresión con variables demográficas, histológicas y con genes blanco que al parecer están siendo reguladas por UNR. Se recolectaron 30 muestras de tumores embebidos en parafina de pacientes con melanoma y 29 *nevus* del hospital Eugenio Espejo. Se aplicó inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo Anti-CSDE1 (ab96124), así como qPCR para evaluar los niveles de expresión de UNR y de 5 genes blanco (ARNs mensajeros) que pueden estar regulados por esta RBP: PTEN, TGFBI, SERPINE1, S100A10 Y GUS β . Se obtuvo una mayor expresión de UNR en tumores que en *nevus*, aunque no se encontró una relación entre expresión proteica y génica de esta proteína, esto debido posiblemente a una traducción dependiente de secuencias IRES descritas previamente en este gen. Además, se encontró una relación entre UNR y TGFB1, GUS β y S100A10, lo que podría indicar que esta proteína regula dichos ARNs mensajeros.

Palabras clave: Cáncer de piel, melanoma, proteínas de unión al ARN, UNR, inmunohistoquímica, qPCR

ABSTRACT

Cancer is considered one of the pathologies with the highest mortality and morbidity rates in the world. The diagnosis is made in later stages, thus increasing the mortality rate. Melanoma is the most aggressive and deadly type of skin cancer, with 132 000 new cases diagnosed and 66 000 deaths annually. On the other hand, research in recent years has shown that RNA binding proteins (RBPs) play an important role in the modulation of specific genes that affect the initiation, development and progression of various types of cancer. Although, the molecular mechanism through which these proteins act is not known clearly, the results from ex vivo and xenographic models experiments suggest that the RBP UNR induces initiation and metastasis in melanoma. The objective of this work was to evaluate the UNR expression in melanoma samples from Ecuadorian individuals and associate this with demographic, histological and target genes that appear to be regulated by UNR. Thirty samples of paraffin embedded tumors were collected from patients with melanoma and twenty nine with nevus from "Eugenio Espejo Hospital". Immunohistochemistry was applied using the Anti-CSDE1 antibody (ab96124) as well as qPCR to determine the level of UNR and 5 target genes that can be regulated by this RBP 5: PTEN, TGFBI, SERPINE1, S100A10 and GUS β expression. A higher expression of UNR was obtained in tumors than in nevus, although a relationship between the protein and gene expression of UNR was not found, possibly due to a translation dependent on previously described IRES sequences in this gene. In addition, we found a relationship between UNR and TGFB1, GUS β and S100A10, which may indicate that this protein regulates those messenger RNAs.

Key words: Skin cancer, melanoma, RNA binding proteins, UNR, immunohistochemistry, qPCR.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I ÈINTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos	4
1.4. Justificación	4
2. CAPÍTULO II ÈMARCO TEÓRICO II.....	6
2.1. Melanoma.....	6
2.2. Proteína UNR	11
2.3. Técnicas empleadas para el diagnóstico del melanoma	12
3. CAPÍTULO III ÈDISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	14
4. CAPÍTULO IV ÈPROCEDIMIENTOS.....	15
4.1. Población y muestra	15
4.2. Materiales y métodos.....	15
4.2.1. Desparafinización y extracción de ARN.....	15
4.2.2. Cuantificación ARN.....	16
4.2.3. Obtención de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	16
4.2.4. Diseño de cebadores.....	16
4.2.5. Evaluación de la expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	19
4.2.6. Inmunohistoquímica.....	20

4.2.7. Análisis de la expresión proteica de UNR utilizando el software ImageJ.....	20
4.3. Análisis estadístico.....	21
5. CAPÍTULO VÈ RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1. Base de datos	23
5.2. Extracción de ARN.....	26
5.3. Obtención de ADNc utilizando RT-PCR.....	27
5.4. Expresión génica de UNR y sus mensajeros mediante qPCR. 27	
5.5. Expresión de UNR mediante inmunohistoquímica	34
5.6. Contraste de la expresión de la proteína UNR y su ARNm.....	37
5.7. Relación entre la proteína UNR y los cinco ARNm diana.....	41
5.8. Relación de UNR con variables demográficas e histológicas... 43	
5.9. Estandarización de PCR en tiempo real (qPCR).....	44
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
6.1. Conclusiones.....	46
6.2. Recomendaciones.....	47
REFERENCIAS.....	48
ANEXOS	55

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El cáncer es considerado una de las patologías con mayor índice de mortalidad y morbilidad en el mundo. En el año 2014, 14 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer y alrededor de ocho millones fallecieron a causa de esta patología. Cada año los casos nuevos de cáncer representan más del 60% de casos totales de esta neoplasia en Sudamérica, América Central, África y Asia (Organización Mundial de la Salud, 2015). Dentro de los distintos tipos de cáncer se encuentra el cáncer de piel, cuya incidencia ha incrementado en los últimos años. Aunque muchos de los casos suelen tener tratamientos eficaces en etapas tempranas, el diagnóstico suele realizarse en etapas tardías, aumentando la tasa de mortalidad. El cáncer de piel se ha clasificado en tres tipos: Carcinoma de células basales (CCB), Carcinoma de células escamosas (CCE) y melanoma (Instituto Nacional del cáncer, 2016). Las formas más comunes del cáncer de piel son CCB y CCE, y se le denomina cáncer de piel no melanoma. A pesar de no ser el más común, los casos de melanoma se han incrementado en los últimos años. Tanto su incidencia como su frecuencia se han incrementado en los últimos años (Faizal, 1995, pp. 138-142).

El melanoma es la neoplasia cutánea más agresiva y mortal. Este tipo de cáncer representa menos del 5% de los casos de cáncer de piel en Estados Unidos, pero es la causa de la mayoría de muertes (Instituto Nacional del cáncer, 2016). Cada año se diagnostican 132 000 nuevos casos y 66 000 personas fallecen a causa del mismo. Los casos se han triplicado en los últimos años, siendo las poblaciones caucásicas las más afectadas (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Las proteínas de unión al ARN, conocidas como *RNA binding proteins* (RBPs), se han identificado como moduladores críticos en relación al inicio y progresión del cáncer. Sin embargo, aún no se conoce con claridad el mecanismo molecular mediante el cual estas proteínas actúan. Se ha demostrado que la proteína UNR (Upstream N-Ras, por sus siglas en inglés) es una RBP y que promueve la invasión del cáncer, induce metástasis y modula el crecimiento tumoral. Por otro lado, los resultados a partir de experimentos en líneas celulares de melanoma (SK-MEL-28, ATCC® HTB-72™) y en ratones, sugieren que UNR induce iniciación y metástasis para este tipo de cáncer (Wurth & Gebauer, *RNA-binding proteins, multifaceted translational regulators in cancer*, 2015, pp. 881-886).

A pesar de que la etiopatogenia del melanoma no está completamente aclarada, existen varios factores que se consideran de riesgo. Uno de ellos es la exposición a la radiación ultravioleta, siendo las poblaciones caucásicas las más afectadas. Existe una clara relación entre la tasa de mortalidad por este cáncer y la ubicación geográfica, siendo las latitudes bajas y las zonas próximas al ecuador las más afectadas (Priario, 2005, pp. 255-268).

1.2. Planteamiento del problema

El melanoma es una patología que en el Ecuador ha incrementado su tasa de incidencia en los últimos años; en el quinquenio 2006-2010 la incidencia estandarizada ha alcanzado el 0,9 por cada 100 000 habitantes en hombres y 0,1 por cada 100 000 habitantes en mujeres (Guerra & Yepez, 2014, pp. 104-106). Esta neoplasia se presenta con baja frecuencia en el país en comparación con otros tipos de cáncer, como es el cáncer de mama y próstata que presentan una mayor incidencia para mujeres y hombres respectivamente. Sin embargo, es considerado una patología de mal pronóstico. Debido a que su diagnóstico por lo

general se la realiza en etapas avanzadas y con variantes clínicas desfavorables (Guerra & Yopez, 2014, pp. 104-106).

Esta neoplasia es considerada como uno de los tipos de cáncer de piel más agresivo en comparación con el cáncer de células escamosas y basales. Un diagnóstico temprano y adecuado del melanoma podría prolongar el tiempo de vida de las personas que presenten esta patología, e incluso se podría lograr la cura del mismo (SOLCA, 2010).

La incidencia de esta patología está asociada, con frecuencia, a los diferentes estilos de vida, así como a los factores genéticos presentes en los individuos. La exposición a la luz ultravioleta (UV) es uno de los principales factores de riesgo para esta patología, ya que genera daños en el ADN de los individuos expuestos. En el Ecuador el mayor porcentaje de casos de melanoma diagnosticados se encuentra en Quito, Cuenca y Guayaquil con una incidencia de 2.85, 2.05 y 0,6 por cada 100 000 habitantes, respectivamente (Bastidas & Guaman, 2013, p. 26).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Determinar la expresión de la proteína UNR en tejido canceroso a partir de muestras de melanoma de individuos ecuatorianos.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Estudiar los niveles de expresión de UNR mediante inmunohistoquímica en muestras de melanoma de pacientes ecuatorianos.
- Determinar la expresión génica de UNR mediante RT-PCR en muestras tumorales de pacientes ecuatorianos.
- Contrastar la expresión de ARNm con la expresión de la proteína UNR en muestras de melanoma de individuos ecuatorianos.
- Relacionar la expresión de UNR con variables demográficas e histológicas.
- Validar la relación de la proteína UNR con respecto a 5 ARNs diana.

1.4. Justificación

En el Ecuador el incremento en las cifras de incidencia y mortalidad de pacientes con melanoma ha generado un problema de salud en el país. Se observa mayor incidencia de esta patología en las principales ciudades del país, debido a su posición geográfica, ya que se encuentran a una mayor altura y los rayos solares llegan de forma perpendicular produciendo mayor radiación UV en el caso de las ciudades de la sierra. La incidencia en Guayaquil se debe principalmente al tiempo de exposición al sol de los habitantes (Cueva & Yépez, 2009, p. 124).

Los métodos empleados para la detección de esta neoplasia se basan fundamentalmente en la sintomatología presentada por los pacientes como es el crecimiento asimétrico de *nevus* existentes. Predecir el comportamiento de este tipo de cáncer ayudaría a establecer tratamientos más adecuados para los pacientes. Es por ello que la presente investigación se enfocará en determinar la relación existente entre las características clínicas y patológicas de los pacientes que presentan melanoma con la expresión de la proteína UNR. Con los resultados

obtenidos se podrá concluir la posible utilidad de la UNR como un factor pronóstico en la progresión del melanoma y así poder establecer tratamientos referidos más específicos y efectivos para cada paciente.

El elevado costo que representa el tratamiento del cáncer en el Ecuador hace que los mismos son poco eficaces e inespecíficos debido a la situación actual que atraviesa el país. El análisis de las proteínas de unión al ARN podría contribuir al diagnóstico del melanoma, ya que este se lo realizaría con mayor eficiencia, especificidad, en corto tiempo y con costos reducidos. Esta investigación también permitirá dilucidar los diferentes mecanismos mediante los cuales actúa la proteína de unión al ARN UNR, sobre los cuales no existe información suficiente y que permitirán avanzar en el estudio de las bases moleculares de progresión tumoral. La base de datos de los pacientes recopilada para esta investigación constituye un aporte significativo para los hospitales donde se lleva a cabo el seguimiento de esta neoplasia ya que proporciona información actualizada de las diferentes variables clínicas, histopatológicas y demográficas que deben ser tomadas en cuenta en la elaboración de las historias clínicas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Melanoma

El cáncer de piel del tipo melanoma es una neoplasia provocada por el desarrollo de los melanocitos de origen neuroectodérmico. Por lo general el desarrollo de estas células se produce en la piel, pero también puede encontrarse en otras partes del cuerpo como los ojos, los genitales y las mucosas. El melanoma es considerado uno de los cánceres más invasivos debido a su potencial metastásico. El tratamiento eficaz hasta la actualidad es la cirugía del *nevus*. Sin embargo, cuando el crecimiento celular es muy avanzado esta neoplasia puede ser letal (ESMO, 2013, pp. 4-6).

Existen varios factores de riesgo asociados a la incidencia del melanoma en la población, que pueden ser endógenos y exógenos. Los factores endógenos comprenden a su vez varios factores como son la concentración melanocítica, la cual indica el número de melanocitos en la superficie cutánea; la relación existente entre la pigmentación y el daño de la piel es inversa. No se ha encontrado resultados que prueben que a una alta concentración de melanocitos el melanoma pueda desarrollarse (Riley, 2003, pp. 548-551).

La incidencia es un factor exógeno de esta patología, la cual se ha incrementado en un rango de 3-7 % cada año en la población caucásica. Este aumento se encuentra asociado a diversos factores de riesgo. Uno de estos es la radiación ultravioleta recibida por la exposición al sol y aquella producida artificialmente. Existe una diferencia marcada entre la incidencia encontrada en hombres y mujeres. Los primeros presentan mayor porcentaje en melanomas gruesos, mientras que las mujeres exhiben mayor proporción de melanomas delgados. De

acuerdo a la edad de las personas diagnósticas, esta patología se encuentra en mayor proporción en mujeres menores a 40 años de edad que en los hombres (Erdei & Torres, 2010, pp. 2-4).

Otro factor de riesgo endógeno es el fenotipo de cada individuo. Los individuos que presentan tez blanca, cabello rubio y ojos claros presentan mayor vulnerabilidad de desarrollar melanoma, ya que su tipo de piel es más susceptible de generar mutaciones en el ADN por los rayos solares. Mientras que las personas de tez oscura presentan una protección natural al sol por la pigmentación contenida en la piel (Burgues & Lllamas, 2011, p. 6), razón por la cual están menos predispuestos a desarrollar cáncer.

La edad es otro factor de riesgo. Se ha comprobado que personas con edad avanzada (mayores de 60 años) tienen mayor tendencia a desarrollar melanoma maligno (Norgaard, Glud, & Gniadecki, 2011, pp. 499-502). Las lesiones precursoras constituyen aproximadamente el 50% del desarrollo de esta neoplasia, dentro de estas se encuentran nevus adquiridos, displásicos, melanocitos congénitos, proliferación melanocítica de la mucosa y acral y el lentigo maligno (SOLCA, 2010).

La genética de un individuo es causa de riesgo. Se ha encontrado que aproximadamente entre el 8 y el 14% de los melanomas malignos se desarrollan en personas que presentan antecedentes familiares de esta neoplasia. Por lo general, se han encontrado mutaciones del gen CDKN2A que es el encargado de codificar para las proteínas que suprimen tumores como son las p14 (ARF) y p16

(INK4A). En menor proporción también se ha encontrado la mutación del gen CDK4 (Ashton-Prolla, et al., 2007, pp. 421-425).

Dentro de los factores exógenos de esta neoplasia se encuentra la exposición solar, y es la más importante para el desarrollo del melanoma. La luz ultravioleta, luz visible y luz infrarroja son componentes de la luz solar. Gracias a la existencia de la capa de ozono la mayor proporción de la luz UV se queda suspendida y atraviesa esta capa una proporción menor. La luz UV se compone a su vez de luz UVA Y UVB, la segunda es la causante de daños biológicos en la piel asociados a la radiación recibida a causa de los rayos solares (Burgues & Lllamas, 2011, pp. 6-7).

Los principales efectos generados por la radiación UV son: generación de radicales libres, daños en el sistema inmune, depreciación de las enzimas antioxidantes, menor expresión de enzimas melanogénicas y daño en el genoma de los queratinocitos. Los individuos que reciben la radiación UV en edades tempranas presentan mayor predisposición de desarrollar esta neoplasia. La percepción de radiaciones UV artificiales como las emitidas por las cámaras de bronceado también promueven el desarrollo del melanoma (Boniol, Autier, Boyle, & Gandini, 2012, pp. 345-357).

Los factores geográficos como la altitud, latitud, reflexión del suelo y la capa de ozono, influyen directamente en la cantidad de radiación UV recibida (OMS, 2009). Cada uno de estos factores contribuyen a la mayor o menor intensidad de las radiaciones UV generadas por los rayos solares y percibidas por las personas. La exposición al sol depende del tipo de trabajo que presenten las personas, aquellas

que realicen actividades al aire libre presentaran mayor riesgo de desarrollar melanoma. El nivel socioeconómico también es un factor relacionado con el desarrollo de esta neoplasia (Burgues & Lllamas, 2011, pp. 6-7). Varios estudios indican que existe mayor incidencia en personas de condiciones económicas bajas debido a las actividades diarias y estilo de vida (González, Vernhes, & Sánchez, 2009, pp. 69-80).

El desarrollo del melanoma está asociado a la exposición de la piel a radiación UV. En su gran mayoría este tipo de cáncer aparece de forma ocasional, mientras que un pequeño porcentaje se genera por factores hereditarios. Los melanomas que presentan síntomas tempranamente crecen de forma superficial y lateral por un largo tiempo, pero con el crecimiento celular de esta neoplasia el sistema inmune se ve afectado significativamente y se produce el crecimiento vertical del melanoma, generando heridas profundas y en ocasiones metástasis (Robertson, Coleman, & Lugo, 1996, pp. 4487-4492).

La expansión del melanoma se genera por tres mecanismos principalmente: a través de las vías linfáticas hasta los nódulos regionales, mediante el torrente sanguíneo en dirección a los órganos viscerales y en el interior de la pared adyacente. Varios datos indican que personas que presenten melanoma pueden generar una segunda neoplasia durante su vida (Bastidas & Guaman, 2013, p. 53).

Basándose en la clasificación clínica existen cuatro tipos de melanoma cutáneo. El melanoma de extensión superficial (MES) es el que se desarrolla con mayor frecuencia en poblaciones que presentan la tez blanca cuya edad oscila entre 18 y

60 años, y se ubica en cualquier porción de la piel. Su evolución es tardía por lo general entre 1- 5 años. Esta neoplasia se puede observar como una placa aglomerada con elevación o como sombra de coloración intensa. Mientras que el melanoma lentigo maligno (MLM) se presenta en individuos caucásicos con una incidencia del 5-12 %. Se desarrolla en mayor proporción en las mujeres de avanzada edad. En el inicio de su desarrollo se observa una lesión sin elevaciones, pero con una parte nodular y de forma asimétrica. Su crecimiento es tardío, al igual que la generación de metástasis. Este tipo de melanoma presenta el mayor grado de supervivencia, aproximadamente el 90% (Wolf, Goldsmith, Katz, Gilchrest, & Paller, 2009, pp. 1137-1142).

El melanoma lentiginoso acral (MLA) se presenta tanto en poblaciones afroamericanas como en caucásicos, su incidencia es mayor en los primeros (Rouhani, HU, & Kirsner, 2009, pp. 248-252). Su crecimiento es acelerado y vertical por lo que genera lesiones más profundas, con frecuencia su desarrollo inicia en las plantas de los pies, cavidades nasales, palmas de las manos y regiones genitales y anales. Los individuos más afectados son aquellos con edades mayores a 65 años. Finalmente, el melanoma nodular (MN) presenta mayor incidencia en las poblaciones caucásicas, y los individuos más afectados son aquellos que tienen una edad promedio de 53 años. Por lo general el MN se desarrolla en la cabeza, el cuello y el tronco, e inicia con la aparición de nevus de coloración azul rojizo o negro. Los principales síntomas de este tipo de neoplasia se los observa por el cambio de color de los nevus (Wolf, Goldsmith, Katz, Gilchrest, & Paller, 2009, p. 1137).

2.2. Proteína UNR

UNR es una proteína de unión al ARN de cadena simple que presenta afinidad por las secuencias ricas en purinas. Por lo general se encuentra localizada en el citoplasma en donde se produce el proceso de traducción del ARNm. La versátil unión que presenta esta proteína al ARN se ha asociado con las funciones que ella cumple como es la inhibición de la apoptosis celular (Wurth & Gebauer, RNA-binding proteins, multifaceted translational regulators in cancer, 2015, pp. 881-882). Esta proteína presenta cinco dominios *cold-shock* (CDSs) y pertenece al grupo de las CDS. Estudios recientes indican que cumple una función importante en la regulación del contenido y la traducción del ARNm. UNR también juega un papel importante en la represión de la traducción de 2 ARNm masculinos y de esta manera compensa la constitución del cromosoma X (Raclet, et al., 2007, pp. 2595-2603).

Análisis de inmunoprecipitación de ARN en *Drosophila melanogaster* indican que UNR presenta afinidad a varios transcritos. Además, en este análisis se encontraron ARNs mensajeros que codifican para reguladores conservados que están relacionados con la progresión del cáncer humano. Con esto se sugiere que esta proteína tiene un papel importante en la proliferación de la progresión del cáncer. La evaluación de UNR en la progresión del cáncer ha indicado que existe sobreexpresión de esta proteína en tumores de melanoma en comparación con los nevus benignos, UNR promueve fuertemente la invasión y la metástasis (Wurth & Gebauer, RNA-binding proteins, multifaceted translational regulators in cancer, 2015, p. 883).

2.3. Técnicas empleadas para el diagnóstico del melanoma

Un diagnóstico temprano de melanoma permite al tratante aplicar una terapia adecuada para lograr una rápida remisión. Para esto es importante conocer las actividades laborales y antecedentes familiares que el paciente presenta. Por otro lado, se realiza un análisis físico de los nevus presentes en el paciente. La regla ABCDE permite el diagnóstico temprano del melanoma donde:

A: asimetría

B: bordes irregulares

C: coloración variable

D: diámetro superior

E: evolución

Existen casos en los cuales es necesario el empleo de técnicas más específicas y sensibles para el diagnóstico de esta neoplasia. La dermatoscopia o epiluminiscencia es una de ellas, la cual permite la examinación de la piel de forma no invasiva, haciendo uso de un sistema y fuente óptica para observar estructuras que se encuentran entre la dermis y la epidermis. Algunos resultados de los exámenes realizados no son claros y se puede confundir con otro tipo de cáncer, entonces es necesario realizar exámenes histopatológicos y biopsias para la confirmación del diagnóstico (Burgues & Lllamas, 2011, pp. 11-12).

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que permite determinar las diferentes facetas de esta neoplasia. Las proteínas usadas con frecuencia para el diagnóstico son HMB45, S-100, Melan A y Ki67. En la realización de esta técnica colorimétrica histopatológica se mide la expresión de una proteína determinada con el uso de anticuerpos marcados con una enzima que tiene la capacidad de hacer visible al sustrato, sin que ello dañe al anticuerpo. Por lo general, la IHQ es

empleada para el desarrollo de fármacos, el diagnóstico de enfermedades y la investigación biológica. En el caso del cáncer, este método permite determinar si es maligno o benigno, el grado, el estadio en el que se encuentra y la identificación del tipo de célula que dio origen al cáncer (Dako, 2009, pp. 47-49).

Para la medición de la expresión de genes que se encuentren involucrados con el desarrollo de esta patología también se puede hacer uso de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), técnica en la cual en un solo proceso se realiza la detección y amplificación. La qPCR permite evaluar los resultados obtenidos después de cada ciclo de PCR con la señal emitida por fluorescencia. Es una técnica que presenta ventajas como la visualización inmediata del resultado, amplio espectro de detección y elevada eficacia (Aguilera, Ruiz, Rocha, Olvera, & Chánez, 2008).

Una variante de la reacción en cadena de la polimerasa de punto final es la PCR múltiple, que permite la amplificación de varias secuencias de ADN diferentes al mismo tiempo y en una sola reacción. Para realizar esta PCR es necesario el uso de varios cebadores que sean diseñados para trabajar de forma adecuada a la misma temperatura durante el procedimiento. Al finalizar el proceso se obtienen múltiples amplicones con tamaños variados y especificidad a distintas secuencias de ADN. Esta variante de PCR con frecuencia es usada para el análisis de mutaciones, detección de polimorfismos y detección de ARN (Elnifro, Ashshi, & Cooper, 2000, pp. 559-570).

CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad de las Américas en el Instituto de Investigaciones biomédicas bajo la dirección científica del máster Alejandro Cabrera, como parte del proyecto “Análisis de la expresión de la proteína UNR como posible biomarcador en el melanoma”.

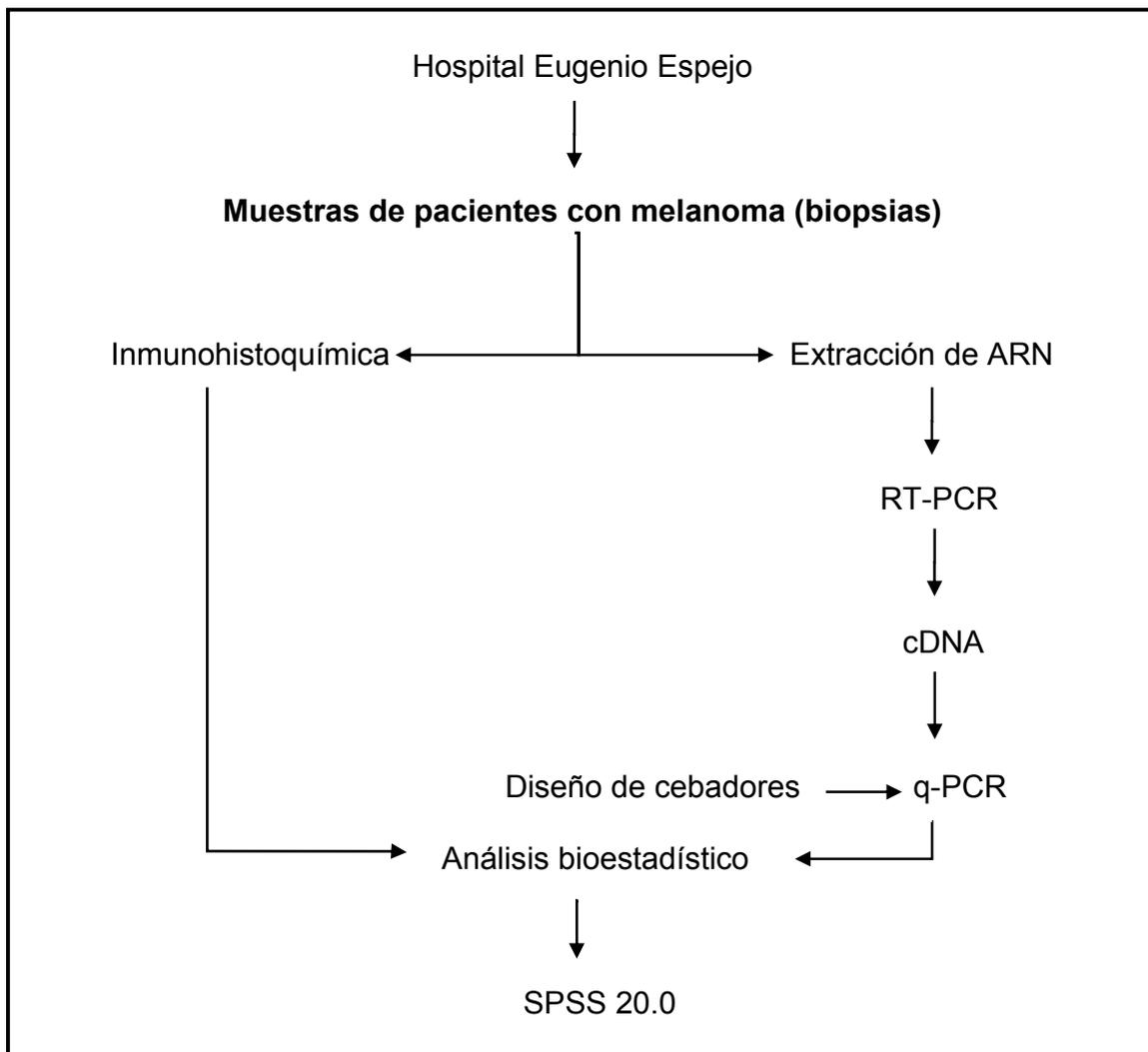


Figura 1. Esquema del diseño experimental realizado

CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Población y muestra

Para la población se consideró el banco de tumores embebidos en parafina del hospital Eugenio Espejo.

Para la selección de la muestra se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión: individuos ecuatorianos con diagnóstico positivo para melanoma y en un rango de edad comprendido entre 18-100 años.

Criterios de Exclusión: individuos no ecuatorianos e individuos ecuatorianos cuya edad no esté dentro del rango de inclusión.

Tamaño de muestra: en vista de que no existe un valor oficial con respecto a los datos de prevalencia e incidencia del melanoma en el Ecuador, se incluyeron todas las muestras de pacientes diagnosticados con melanoma en los años 2013, 2014 y 2015. Así, se obtuvo una n=30 para los casos, y una n=29 para los controles, para los cuales se consideraron las biopsias de pacientes con nevus, del mismo banco de tumores, de los años 2014 y 2015.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Desparafinización y extracción de ARN

Para la extracción de ARN a partir de las muestras embebidas en parafina se realizaron cortes de 10µm del bloque de parafina, utilizando un micrótomo HM-35 (Thermo Scientific, Estados Unidos). En tubos eppendorff estériles de 1,5 mL se colocaron 3 micro-cortes del tejido tumoral a los que se les añadió 1 mL de xilol ($C_6H_4(CH_3)_2$) y se mezcló con vórtex por 1 min. Seguidamente, las muestras se incubaron durante 5 min en el termo bloque a 65°C. Una vez culminada la incubación se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante sin tocar el pellet formado en la base del tubo. Se repitió el lavado con xilol. A

continuación, se agregó 1 mL de etanol al 100% y se mezcló con vórtex por 1 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 min y se procedió a descartar el sobrenadante. Se repitió el lavado con etanol al 100%. y el pellet resultante se secó a 55°C por 20 min. Seguidamente se procedió a la extracción de ARN, empleando el kit de extracción High Pure FFPE RNA (Roche, 2016) teniendo en cuenta la instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN fue determinada utilizando el NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

4.2.2. Cuantificación ARN

La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260nm utilizando el NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). La pureza del ARN obtenido se la obtuvo mediante la relación de las absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

4.2.3. Obtención de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Para obtener el cDNA se empleó el protocolo First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT (Invitrogen, 2010) siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADNc obtenido se cuantificó utilizando el NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

4.2.4. Diseño de cebadores

Los cebadores fueron diseñados utilizando la herramienta Primer Blast (NCBI), y el software Primer3 (Untergasser, et al., 2007). Para ello, se consideraron las siguientes condiciones: tamaño del producto de PCR (entre 150 y 200 pb), número de primers: 10, Tm: 57 °C mínimo y 63 °C máximo. Los primers obtenidos fueron

validados con el software PCR Primer Stats (Sequence Manipulation Suite-SMS), donde se evaluaron las condiciones de la qPCR para obtener los mejores candidatos. El análisis arrojó 1 par de cebadores óptimos para la amplificación del gen que codifica para la proteína UNR (CSDE1), y 5 pares de cebadores para determinar la expresión de 5 genes regulados por UNR, y que están involucrados en el proceso de progresión tumoral. Se seleccionó el gen GAPDH de expresión constitutiva como control interno. La secuencia de todos los cebadores se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.

Cebadores diseñados para la amplificación del gen UNR y genes regulados por UNR

Nombre de los oligos	Secuencia (5'-3')
GAPDH-F	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
GAPDH-R	TTCAGCTCAGGGATGACCTT
CSDE1-F	AGATTGTGGAGGAGGGCGAT
CSDE1-R	GGGGTGTGATGTTGTAAGCC
TGFBI-F	CCCTGAGAGACCTGCTGAAC
TGFBI-R	GAGATGATCGCCTTCCCGTT
PTEN-F	AGACTTGAAGGCGTATACAGGA
PTEN-R	AAGTTCTAGCTGTGGTGGGTT
GUS β -F	CAAGCATGAGGATGCGGACA
GUS β -R	GCTGGTACGGAAAGCGTTGG
S100A10-F	CAAATGGAACACGCCATGGAAA
S100A10-R	TCTACACTGGTCCAGGTCCTT
SERPINE1-F	TCCTGGTTCTGCCCAAGTTC
SERPINE1-R	CCACTCTCGTTCACCTCGAT

Nota. GAPDH= glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase human, CSDE1= cold shock domain containing E1, TGFBI= Transforming Growth Factor Beta Induced, PTEN=

phosphatase and tensin homolog, GUS β = glucuronidase, beta, S100A10= S100 calcium binding protein A10 , SERPINE1= serpin family E member 1 ; por sus siglas en ingles.

4.2.5. Evaluación de la expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para realizar la PCR en tiempo real se utilizó el equipo Stratagene MX3005P (Biotecon Diagnostics, Potsdam, Alemania). Se empleó GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Estados Unidos) suplementado con 0,4 ul de cloruro de magnesio. Se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante para todas las muestras de ADNc. El volumen final de la reacción fue de 20 uL. Se utilizaron dos programas diferentes en el termociclador, uno para la amplificación de PTEN (Tabla 2), y otro para el resto de cebadores (Tabla 3), y se corrieron 35 ciclos en ambos:

Tabla 2.

Programa empleado para qPCR del gen PTEN

Etapas de la qPCR	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	2:00 minutos
Desnaturalización	95 °C	00:15 segundos
Hibridación	56 °C	00:30 segundos
Elongación	72 °C	00:22 segundos
	95 °C	1:00 minuto
Elongación final	54 °C	00:30 segundos
	95 °C	00:30 segundos

Tabla 3.

Programa empleado para qPCR de los genes GAPDHH, CSDE1, TGFBI, GUS β , S100A10, SERPINE1

Etapa de la Qpcr	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	2:00 minutos
Desnaturalización	95 °C	00:15 segundos
Hibridación	58 °C	00:30 segundos
Elongación	72 °C	00:22 segundos
	95 °C	1:00 minuto
Elongación final	56 °C	00:30 segundos
	95 °C	00:30 segundos

4.2.6. Inmunohistoquímica

Para realizar la tinción inmunohistoquímica de las muestras embebidas en parafina se utilizaron cortes de 10 μ m de cada uno de los bloques utilizando un micrótopo HM-35 (Thermo Scientific, Estados Unidos). Los cortes de los tejidos fueron incubados en una estufa, para eliminar la mayor parte de la parafina. Posteriormente, se utilizó el kit EnVision™ FLEX, High pH, y se siguieron las instrucciones del fabricante (Dako, pp. 9-10). El anticuerpo primario usado fue el Anti-CSDE1 (ab96124) de Abcam, que reconoce un epítipo del CSDE1 humano (AAH32446) en la región de los aminoácidos 167-372.

4.2.7. Análisis de la expresión proteica de UNR utilizando el software ImageJ

Una vez realizado la tinción inmunohistoquímica, se fotografiaron los cortes empleando un microscopio óptico Ecilpse E200 (NIKON, 2016) acoplado a una cámara fotográfica Ds-Fi1c (NIKON, 2016) conectada a una computadora. Para medir la intensidad de la tinción se utilizó el software ImageJ

(<https://imagej.nih.gov/ij/>), donde se ingresaron todas las fotografías realizadas.

El programa permite cuantificar los píxeles en una imagen, de esta forma, se pudo determinar la diferencia en la intensidad de la tinción en los cortes. Para calcular la expresión de la proteína UNR a partir de la intensidad de la tinción de los cortes, se siguió el protocolo propuesto por Varghese, Burhari, Malhotra, & De (2014).

4.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS Statics 22.0 (SPSS, Chicago, IL). Una vez obtenidos los resultados tanto de inmunohistoquímica como de qPCR, se procedió a normalizar los datos obtenidos, para lo cual se utilizaron dos algoritmos. En el caso de la inmunohistoquímica, se utilizó el algoritmo $f=255-i$, donde f corresponde a la intensidad final del marcador, 255 es la intensidad máxima, mientras que i es la intensidad de cada placa de inmunohistoquímica (Fuhrich, Lessey, & Savaris, 2013, pp. 212-213). A partir de estos, se obtuvo el promedio de los CTs para cada uno de los ARNm analizados. Posteriormente, se realizó una resta entre el control interno y cada uno de los ARNm, considerando por separado tejido tumoral y tejido sano. Con este resultado se utilizó el algoritmo 2^n , donde n corresponde al resultado obtenido al restar tejido tumoral del tejido normal, de los datos obtenidos en la última operación. Así, cuando el resultado es mayor a uno, se considera una mayor expresión del tejido tumoral que del tejido normal, caso contrario, se aplica el algoritmo $1/z$, donde z representa el último valor obtenido, y en este caso se considera una mayor expresión en tejido normal que en tumoral (Schmittgen & Kenneth, 2008, p. 1102).

Para el análisis estadístico se realizó una prueba de homogeneidad para comprobar que se trataba de una distribución normal, tanto para los resultados obtenidos en inmunohistoquímica, como para aquellos obtenidos en la qPCR. Para

considerar una distribución normal se tomó un valor de significancia $p > 0,05$, sabiendo que esto significa que no hay diferencias en la media de los datos totales. Para los valores que seguían una distribución normal se aplicó un análisis de varianza ANOVA, mientras que para aquellos que no mostraban una distribución normal se realizó un análisis U de Mann Whitney. Se consideró, en todos los casos, un nivel de confianza del 95%, y en algunos casos también del 99%. Finalmente, para relacionar los resultados entre ellos, se realizó un análisis de correlación utilizando el coeficiente Rho de Spearman.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Base de datos

La evaluación de los factores endógenos y exógenos asociados con el desarrollo del melanoma se realizó analizando la muestra poblacional comprendida por 59 pacientes del hospital Eugenio Espejo, de la ciudad de Quito. La información de los pacientes se ha clasificado en variables demográficas: edad y género, e histológicas: pT (tumor primario), N (nódulos regionales), M (metástasis a distancia) y tipo histológico.

La muestra de pacientes estuvo conformada por 30 casos (pacientes con melanoma) y los controles por 29 pacientes con nevus. La muestra estuvo conformada por 12 hombres (40%) en un rango de edad entre 60 y 89 años, y 18 mujeres (60%), en un rango de edad entre 48 y 91 años. El promedio de edad de los pacientes evaluados fue de 73 años. Así también lo reportan autores como Leitner (2006, p.86), quien encontró un incremento en la incidencia de melanoma en los adultos mayores de 60 años de edad.

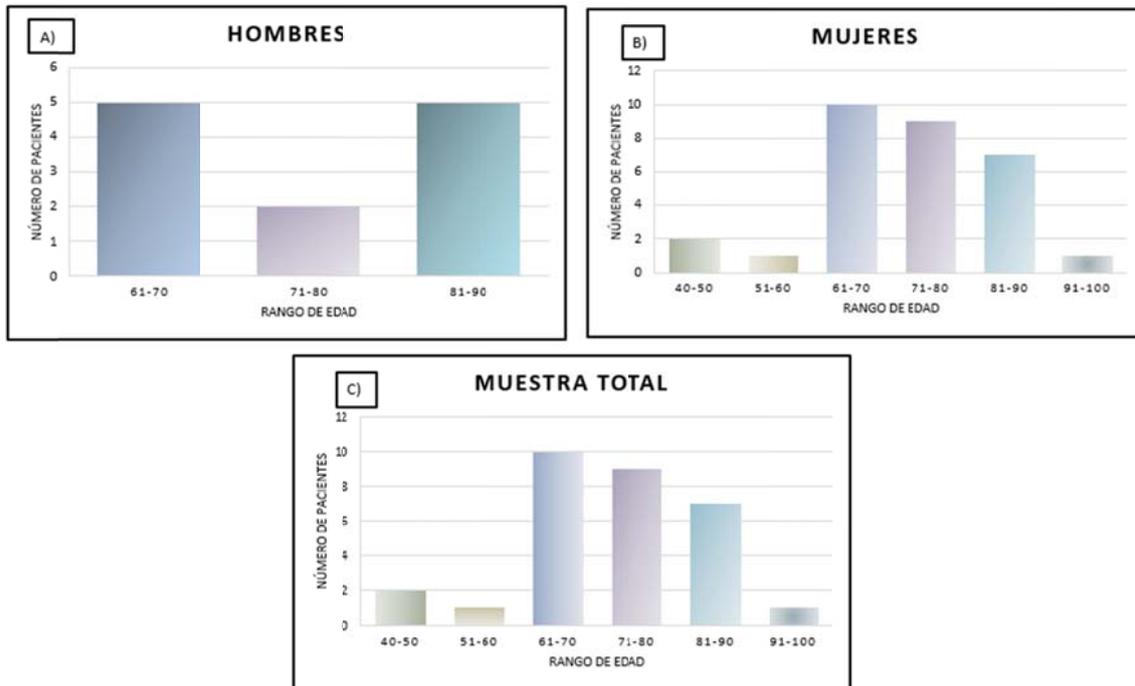


Figura 2. Distribución por edades de los casos de melanoma diagnosticados en los años 2013, 2014 y 2015. **(A)** muestra poblacional masculina. **(B)** muestra poblacional femenina. **(C)** población total de individuos con melanoma.

El mayor porcentaje de individuos masculinos se encontraba en el rango de edad comprendido entre 61-70 (41.66%) y 81-90 (41.66%), mientras que en las mujeres, el mayor porcentaje se ubicó en el rango 61-70 (55.55%). Por tanto, el mayor número de individuos se ubicó en el rango de edad comprendido entre 61 y 70 años. Estos resultados contrastan con los encontrados por Leitner (2006, pp. 87-89), quien encontró que la edad media para el diagnóstico es de 59 años en el caso de los hombres, y 54 años en el caso de las mujeres. Otros autores, por otro lado, consideran que la edad promedio para el diagnóstico de melanoma es de 60 años (Saldivar, Castillero, & López, 1998, pp. 210-215). Por otra parte, si se toma en consideración el género, se observa una mayor presencia de melanoma en el género femenino que en el masculino, con un 20% más de mujeres que de hombres que presentan esta patología.

Dentro de las variables histológicas analizadas se consideró pT (tumor primario), N (nódulos regionales) y M (metástasis a distancia), donde se obtuvieron los siguientes resultados: considerando la variable pT se encontraron cuatro categorías de las quince reportadas por la OMS (World Health Organization (WHO), 2006, p. 51). El 23,3% de los pacientes presentó órganos o tejidos infiltrados por cáncer que no pudieron ser evaluados (pTX). El 3,3% de los pacientes presentó tumores primarios con un tamaño comprendido entre 1 y 2 mm (pT2). También se encontró que el 3,3% de los pacientes presentó tumores comprendidos entre 2 y 4 mm de tamaño (pT3), mientras que el 70% de los pacientes presentó tumores de más de 4 mm (pT4). Por tanto, el mayor porcentaje está comprendido en pT4, resultados que contrastan con los obtenidos por Marcoval, et al. (2008, pp. 464-468), quien encontró que el mayor porcentaje de sujetos presentaba una clasificación pT1, es decir con un tumor menor a 1 mm. Esta diferencia puede deberse a que la muestra obtenida por Marcoval fue de una población de la costa mediterránea, mientras que en esta investigación las muestras fueron tomadas de personas mestizas.

Con respecto a los nódulos regionales (N), se observó que un 93,3% de los pacientes presentaron nódulos que no podían ser evaluados (NX); mientras que un 3,3% presentaron metástasis intralinfática microscópica (N2a). El mismo porcentaje se obtuvo en pacientes que presentaron metástasis satelital sin nódulos (N2c). En relación a la metástasis a distancia (M), se obtuvo que el 100% de los casos presentaron metástasis que no pudo ser evaluada.

Al analizar el tipo histológico se encontraron cinco tipos de los diez reportados por la OMS (2006, p.51). El 30% de los pacientes presentó melanocitos que no están clasificados dentro de los fenotipos descritos (melanoma sin clasificación). El 16,6% presentó melanoma nodular, también conocido como melanoma

amelanótico. El 30% de los casos presentó melanoma lentigo maligno, que aparece generalmente en personas de edad avanzada (World Health Organization (WHO), 2006, p. 51). El 20% presentó melanoma acral lentiginoso, el cual se presenta generalmente en las personas de raza negra, mientras que, el 3,3% presentó melanoma desmoplásico, que es una variable clínica patológica poco frecuente que se presenta como una lesión superficial y que posteriormente desarrolla un tumor profundo.

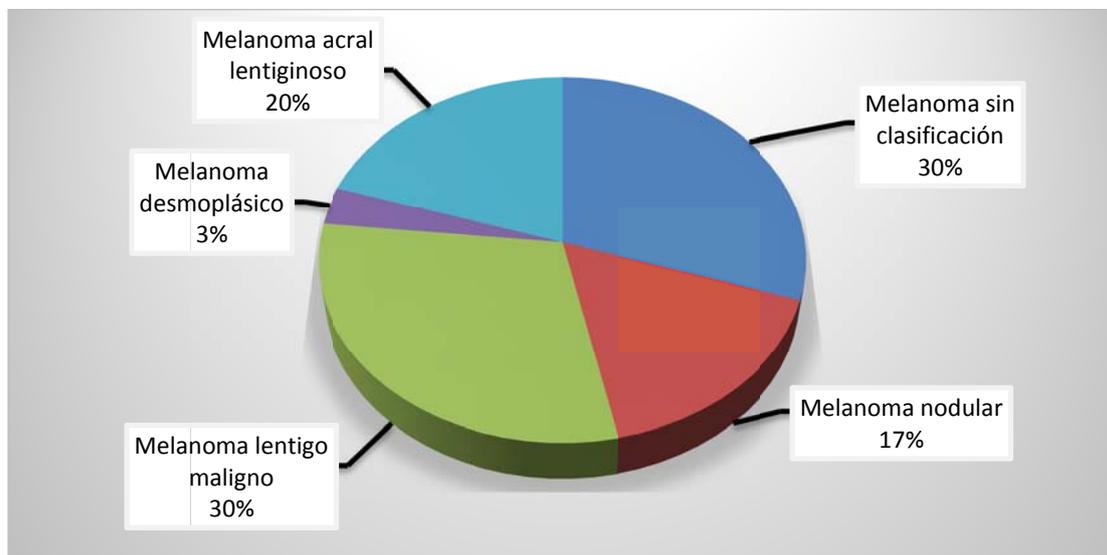


Figura 3. Distribución por el tipo histológico de melanoma de los pacientes diagnosticados en el hospital Eugenio Espejo.
(A) Compreendido en el año 2013-2015.

5.2. Extracción de ARN

Utilizando el protocolo descrito en el apartado de metodología, se obtuvo el ARN a partir de 30 muestras de pacientes y 28 controles. Cada uno de los ARN obtenidos fue cuantificado utilizando NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), la mínima concentración obtenida fue 7,7 ng/uL y la máxima

de 158,6 ng/uL. Todas las muestras fueron diluidas hasta alcanzar una concentración de 30 ng/uL. Esta concentración fue la óptima para evaluar la expresión génica por qPCR. Para asegurar la calidad y pureza de las muestras de purificadas, la relación de absorbancias A260/A280 debía encontrarse entre 2,0-2,2 para considerar a la pureza como óptima. Mientras que, la relación A260/A230 < 1.5 para que no existiera contaminación con sales, carbohidratos y fenoles (Desjardins & Conklin, 2010). Las muestras de ARN obtenidas se encontraron dentro del rango de pureza y sin contaminación.

5.3. Obtención de ADNc utilizando RT-PCR

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado de metodología, se obtuvieron 58 ADNc, uno por cada ARN extraído, en un volumen de 25 uL. Para que la calidad del material genético obtenido sea la óptima, la relación A260/A280 debía encontrarse entre 1,8 y 2; mientras que la relación A260/A230 debía ser menor a 1,5 para asegurar que no existía la presencia de agentes que pudieran afectar a la pureza del ADNc (Desjardins & Conklin, 2010). Los ADNs codificantes obtenidos se encontraban dentro de los rangos de calidad y pureza establecidos.

5.4. Expresión génica de UNR y sus mensajeros mediante qPCR

Una vez normalizados los datos utilizando el algoritmo descrito por (Schmittgen & Kenneth, 2008, p. 1102), se obtuvieron los resultados reflejados en la tabla 4. En la primera fila se observan los valores obtenidos al aplicar $2^{\Delta n}$, con lo que se encontró que la expresión de UNR, TGFBI, S100A10 Y SERPINE1, es mayor en el tejido tumoral que en tejido sano, 2,082, 1,181, 1,797 y 1,183 veces más en melanoma que en nevus, respectivamente. Mientras que PTEN y GUS β ,

presentaron una mayor expresión relativa en tejido normal con respecto al tejido tumoral, -3,633 y -1,282, respectivamente.

Los resultados del estudio mediante qPCR indicaron que la expresión relativa de UNR es dos veces mayor en el tejido tumoral que en los controles; sin embargo, al realizar el análisis estadístico aplicando el test no paramétrico U de Mann Whitney no se obtuvieron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con el estudio realizado por (Schepens, et al., 2007, p. 160) quienes encontraron que el ARNm de UNR regula negativamente su traducción, es por ello que no existe una relación directa entre los niveles de ARNm y de proteína. Por otra parte, que las diferencias en la expresión génica no hayan sido estadísticamente significativas, pudo deberse a que las muestras procesadas se encontraban en estadios diferentes de la progresión tumoral. Estudios previos han reportado, que la expresión del RNA mensajero de UNR es mayor en estadios primarios y metastásicos si se compara con la expresión en tejido sano (nevus) (Wurth & Gebauer, 2015, p. 883).

Se ha observado que casi todos los ARNs mensajeros realizan la traducción a través del mecanismo cap-dependiente. Cuando inicia este proceso la unidad ribosómica menor es reclutada por el ARNm. Sin embargo, cuando la traducción se produce en condiciones de estrés, se activa el mecanismo cap- independiente y los eventos cap- dependientes se reducen. Existen varias formas de traducción independientes de cap y dentro de este grupo se encuentran las secuencias IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), estas secuencias son estructuras del ARNm 5' UTRS (marcos de lectura abiertos) que permiten capturar a subunidades ribosomales sin la intervención de la cap (Wurth & Gebauer, 2015, pp. 885-886).

Estudios realizados *in silico* con el ARNm de UNR han demostrado que este presenta secuencias IRES; sin embargo, estos datos no han sido corroborados a nivel *in vitro*.

A nivel post-transcripcional los ARNs pre-mensajeros a través del splicing alternativo producen varias isoformas incluyendo diferentes 5' UTRs, que en efecto, alteran la traducción. Estas se unen de forma competitiva a la región 5'UTR de UNR, una que promueve la traducción (PTB) y otra que la inhibe (HNRNPC), provocando así la diversificación de los ARNs mensajeros de UNR en el extremo 3'UTR por el uso de señales alternativas de poliadenilación. Una posible explicación de los resultados obtenidos aplicando el test no paramétrico U de Mann Whitney podría ser por la presencia de las secuencias IRES en los ARNs mensajeros y el splicing alternativo que experimentan los ARNs pre-mensajeros (Weeraratna & Gorospe, 2016, p. 657).

El melanoma en la actualidad es considerado una de las neoplasias más agresivas que presenta una etiología genética compleja y en etapas avanzadas el tratamiento no es eficaz. Si bien existen varios genes que contribuyen con el desarrollo y proliferación del cáncer, también existen aquellos que actúan como supresores de tumores. Uno de estos es el gen PTEN (fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa) el cual se encuentra involucrado en el desarrollo del melanoma. Varios estudios han demostrado que la expresión de este gen es mayor en tumores benignos que en tumores cancerosos (Whiteman, et al., 2002, pp. 63-67).

La expresión de PTEN disminuye y está relacionado con la agresividad del cáncer en reportes previos se ha encontrado que esta disminución está asociada a la

expresión de protooncogenes como el BRAF. La disminución de su expresión es más notable cuando existen melanomas metastásicos y un aumento en la profundidad de invasión de la piel por melanoma; en términos clínicos escala de Breslow. Así también se ha visto que la pérdida de expresión de PTEN por factores hereditarios no contribuye al desarrollo del melanoma (Goel, Lazar, Warneke, Redston, & Haluska, 2006, pp. 155-157). Los resultados obtenidos indican que este gen se expresa 3,633 veces más en los controles (tejido sano) con respecto a los casos (tejido canceroso) (Tabla 4 y Figura 4). Al realizar los análisis estadísticos la significancia obtenida fue menor a 0.005 (Tabla 5 y 6), lo cual confirma los datos bibliográficos reportados anteriormente.

En el estudio realizado se encontró otro gen que se expresaba más en el tejido sano (Tabla 4). El gen GUS β (Beta-glucoronidasa), se expresa 1,282 veces más en los controles con respecto al tejido tumoral. Sin embargo, al realizar los análisis estadísticos tanto paramétricos como no paramétrico no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6 y Figura 4). Esto pudo deberse a que en las investigaciones realizadas en melanoma este gen es tomado como control interno (Serafina, et al., 2009, pp. 850-853; Heidenreich, et al., 2014, p. 6) o como control negativo (Wurth, et al., 2016, pp. 700-705), y no ha sido reportada su función como oncogén o gen supresor de tumores.

Las proteínas de matriz extracelular (ECM) juegan un papel importante tanto en el crecimiento como en el desarrollo de la metástasis en el cáncer. El factor de crecimiento beta-inducible (TGFB1) es producido por estas proteínas y puede tener dos funciones importantes en esta patología: puede actuar como supresor o como promotor de tumores (Ween, Oehler, & Ricciardelli, 2012, págs. 10442-10477). Se ha reportado la expresión de TGFB1 se en melanoma humano.

En la investigación realizada por Lauden, et al. (2014, pp.1675-1685) se contrastó la expresión de ARNm en biopsias humanas que presentaban melanoma en estadios primarios y metastásicos con respecto a nevus benignos. Se observó que la expresión obtenida en los melanomas primarios y nevus benignos no variaba significativamente, mientras que al comparar los tejidos metastásicos con los nevus, la diferencia obtenida fue de 1,181 veces más en tejido canceroso que en normal (Tabla 4) lo cual concuerda con los estudios analizados previamente. Sin embargo, al realizar los análisis estadísticos (Tabla 5, 6 y Figura 4) no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tabla 4.

Expresión relativa de los genes estudiados en tejido tumoral y sano

	$2^{\Delta n}$						
	HK	UNR	PTEN	TGFBI	GUS β	S100A10	SERPINE1
Tejido_tumoral/ Tejido_normal	-	2,082	0,275	1,181	0,780	1,797	1,183
Fold change en expresión (< 1)			-3,633		-1,282		

Nota. n = tejido normal-tejido tumoral.

Tabla 5.

Análisis de varianza de la expresión de los ARNs mensajeros de los genes estudiados

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
UNR	Intergrupar	5,297	1	5,297	1,357	0,249
	Intragrupar	222,441	57	3,902		
	Total	227,738	58			
PTEN	Intergrupar	40,842	1	40,842	7,559	0,008
	Intragrupar	307,964	57	5,403		
	Total	348,806	58			
TGFBI	Intergrupar	978,026	1	978,026	2,231	0,141
	Intragrupar	24989,158	57	438,406		
	Total	25967,185	58			
GUS β	Intergrupar	2,721	1	2,721	0,445	0,507
	Intragrupar	348,352	57	6,111		
	Total	351,073	58			
S100A10	Intergrupar	157,203	1	157,203	3,144	0,082
	Intragrupar	2849,816	57	49,997		
	Total	3007,019	58			
SERPINE1	Intergrupar	2,102	1	2,102	0,786	0,379
	Intragrupar	152,476	57	2,675		
	Total	154,578	58			

Nota. gl=grados de libertad. Sig=valor P. (P) < 0,05. Una cola

Tabla 6.

Test no paramétrico U de Mann Whitney de la expresión de los ARNs mensajeros de los genes estudiados

Hipótesis Nula	Significancia	Decisión
La expresión de UNR es la misma en los casos y en los controles	0,048	Rechaza la hipótesis nula
La expresión de PTEN es la misma en los casos y en los controles	0,014	Rechaza la hipótesis nula
La expresión de TGFBI es la misma en los casos y en los controles	0,564	Acepta la hipótesis nula
La expresión de GUS β es la misma en los casos y en los controles	0,682	Acepta la hipótesis nula
La expresión de S100A10 es la misma en los casos y en los controles	0,655	Acepta la hipótesis nula
La expresión de SERPINE1 es la misma en los casos y en los controles	0,909	Acepta la hipótesis nula

Nota. (P) < 0,05.

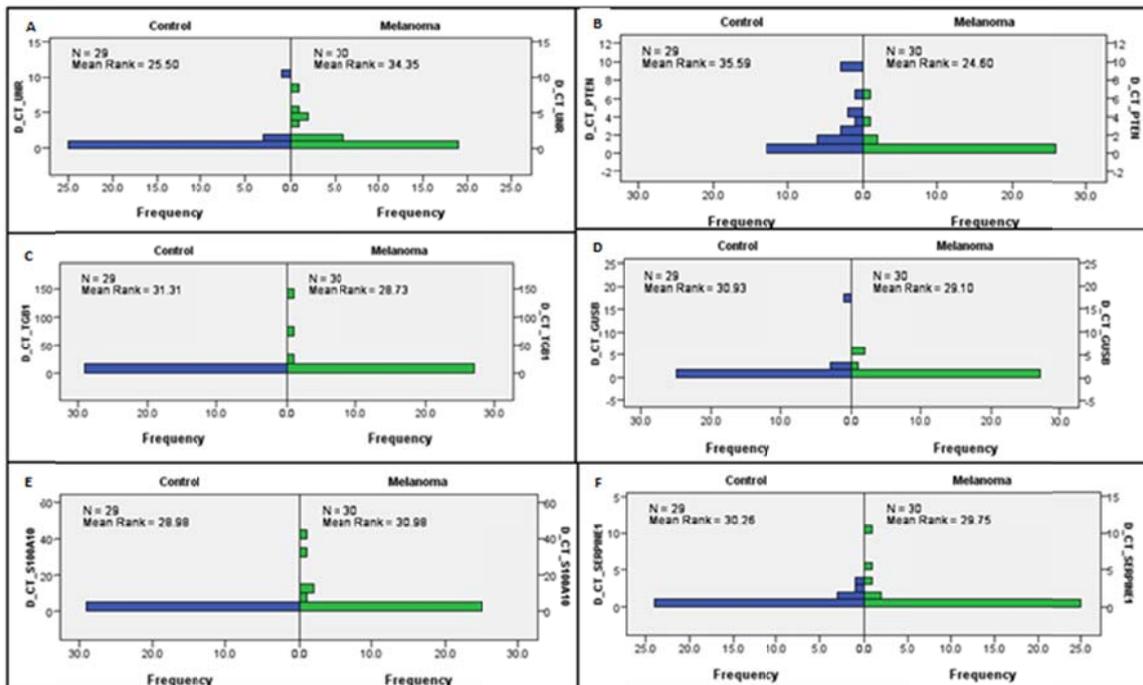


Figura 4. Comparación de la expresión caso-control de los ARNs mensajeros. **A)** Relación de la expresión caso-control de UNR. **B)** Relación de la expresión caso-control de PTEN. **C)** Relación de la expresión caso-control de TGFBI. **D)** Relación de la expresión caso-control de GUS β . **E)** Relación de la expresión caso-control de S100A10. **F)** Relación de la expresión caso-control de SERPINE1.

5.5. Expresión de UNR mediante inmunohistoquímica

Al observar la tinción inmunohistoquímica al microscopio óptico, se visualizó una mayor intensidad de la tinción en los tejidos tumorales con respecto a los tejidos sanos, como se muestra en la figura 5. La cuantificación de la intensidad de la tinción así como las diferencias encontradas en la intensidad de la señal entre la epidermis y en la dermis indican que UNR se expresa con mayor intensidad en el tejido canceroso.

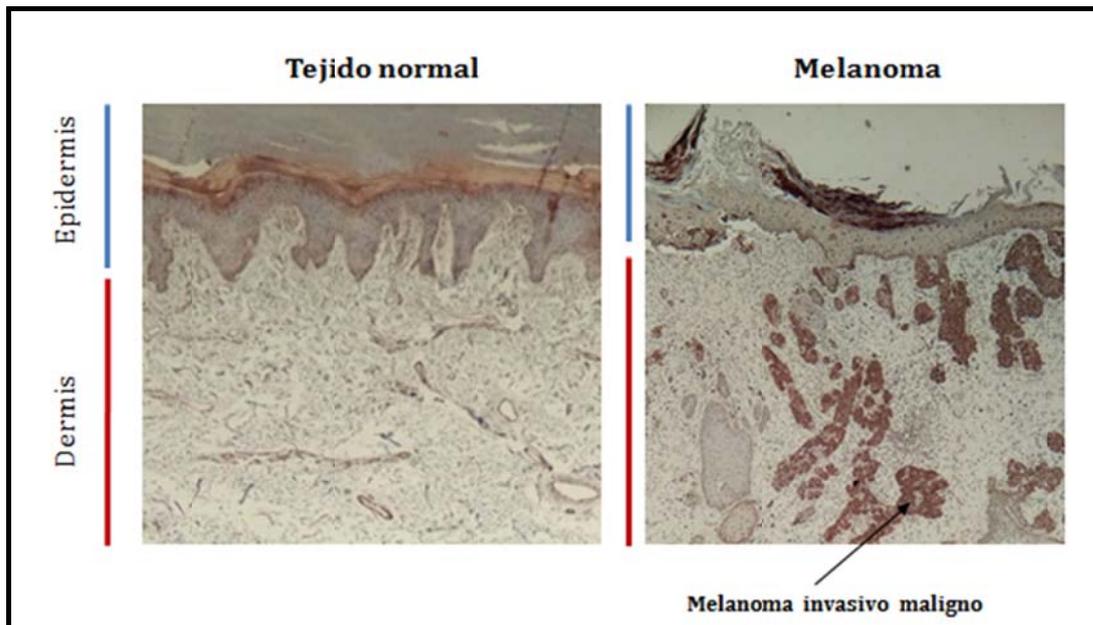


Figura 5. Expresión de UNR en tejido normal y tumoral, magnificación 40X

Para corroborar esta observación se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la intensidad de la tinción. El análisis de varianza realizado, dio como resultado una significancia menor a 0.05, que indica que existe diferencias significativas entre la expresión de UNR en tejido normal y canceroso (Tabla 7).

UNR es una proteína de unión al ARN, que pertenece a la familia de las RBPs. Se ha encontrado que esta proteína interviene en los procesos de transcripción, homeostasis celular y además un papel fundamental en la proliferación y tumorigénesis en el cáncer (Wurth & Gebauer, 2015, pp. 881-882). Estudios realizados previamente reportan que la expresión proteica de UNR es mayor en melanoma con respecto a la expresión presentada en nevus (Wurth, et al., 2016, pp. 701-702). Esto puede deberse a que UNR es una proteína encargada de la regulación de la traducción (Schepens, et al., 2007, pp. 160-162). Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con estudios anteriores existe mayor

expresión de UNR en cortes histológicos de melanoma en comparación con la expresión en nevus benignos. Los datos obtenidos fueron corroborados con los análisis estadísticos realizados ya que la significancia obtenida es mucho menor a 0.05 lo que indica que la diferencia de expresión es altamente significativa (Tabla 6). Si bien existe diferencia en la expresión la proteína UNR, esta no puede ser considerada como un biomarcador para la detección de melanoma ya que existe expresión en tejido sano. Como se observa en la Figura 6 existe solapamiento en la expresión en melanoma y en los controles.

Tabla 7.

Análisis de varianza (ANOVA) de las muestras y los controles de inmunohistoquímica con el marcador proteico UNR

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
IHC_UNR	Intergrupar	24135,038	1	24135,038	41,350	0,000
	Intragrupar	21596,178	37	583,680		
	Total	45731,216	38			

Nota. gl= grados de libertad; (P) < 0,05. IHC = Inmunohistoquímica

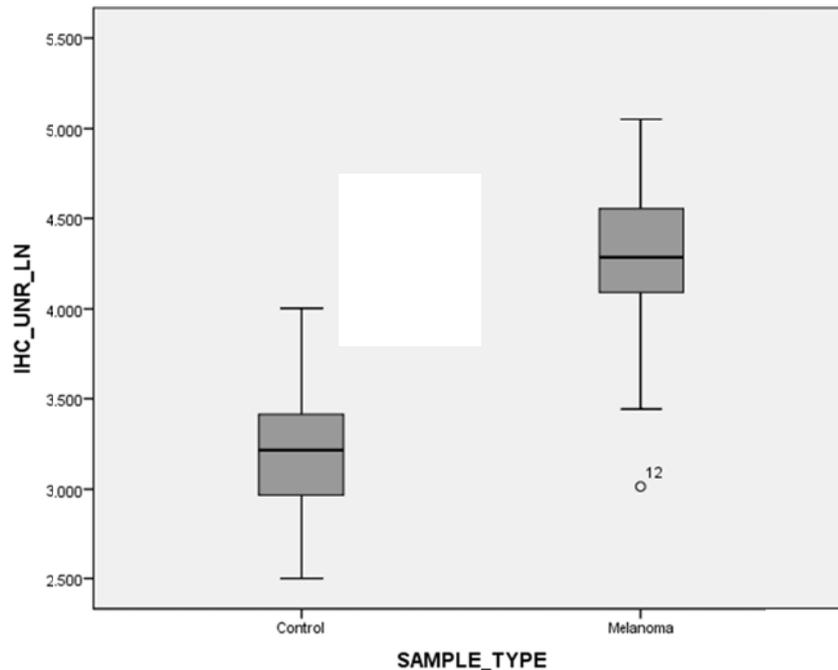


Figura 6. Representación gráfica de la expresión proteica de UNR. “Sample type”= control y casos. “IHC_UNR_LN”= resultados del análisis de los resultados de la tinción inmunohistoquímica. Nivel de confianza = 95%.

5.6. Contraste de la expresión de la proteína UNR y su ARNm

Los resultados obtenidos en qPCR y en inmunohistoquímica fueron contrastados. Se realizó una correlación utilizando el coeficiente de Spearman, donde se encontró un valor (P) de 0,390, lo cual indica que no existe una correlación entre ambos (Tabla 8). Esto sugiere que existen otros mecanismos que están involucrados en la transcripción. Como se indicó anteriormente la proteína UNR presenta secuencias IRES, las cuales activan el proceso de traducción cap-independiente, relacionado con el cáncer debido a que se activa durante el proceso de crecimiento tumoral. Se cree que las RBPs actúan de dos formas, la primera es que pueden comportarse como chaperonas del ARN y así inducir a las secuencias IRES específicas para una adecuada traducción; y la segunda es que incorporan cofactores de la maquinaria de traducción. Estos datos sugieren que el mensajero de UNR contiene secuencias IRES que permiten su autorregulación y

por lo tanto, no existe expresión similar de UNR a nivel génico y proteico (Wurth & Gebauer, 2015, pp. 881-886).

Tabla 8.

Contraste de la expresión génica y proteica de UNR

Rho de Spearman		IHC_UNR	qPCR_UNR
IHC_UNR	Coeficiente de correlación	1,000	0,142
	Sig. (2-colas)	-	0,390
	N casos	39	39
qPCR_UNR	Coeficiente de correlación	0,142.	1,000
	Sig. (2-colas)	0,390	-
	N	39	59

Nota. (P) < 0,01. IHC = Inmunohistoquímica

No obstante, se realizó un análisis de correlación dividiendo la muestra en controles y casos. Sin embargo, tampoco se obtuvo una correlación en ninguno de los análisis. En el caso de los controles, se obtuvo un valor (P) de 0,567 (Tabla 9), mientras en los casos, se obtuvo un valor (P) de 0,220 (Tabla 10). Estos resultados refuerzan los obtenidos anteriormente, e indican que la expresión proteica de UNR es marcadamente significativa en melanoma, mientras que la expresión génica dependerá de varios factores como son el splicing alternativo de los ARNs pre-mensajeros, la presencia de secuencias IRES (Weeraratna & Gorospe, 2016, p. 656) y los estadios de las muestras empleadas (Wurth, et al., 2016, p. 701).

Tabla 9.

Contraste de expresión génica y proteica de UNR en controles

Rho de Spearman		IHC_UNR	qPCR_UNR
IHC_UNR	Coeficiente de correlación	1,000	-0,140
	Sig. (2-colas)	-	0,567
	N	19	29
qPCR_UNR	Coeficiente de correlación	-0,140	1,000
	Sig. (2-colas)	0,567	.
	N	19	29

Nota. (P) < 0,01. IHC = Inmunohistoquímica

Tabla 10.

Contraste de expresión génica y proteica de UNR en casos

Rho de Spearman		IHC_UNR	qPCR_UNR
IHC_UNR	Coeficiente de correlación	1,000	-0,287
	Sig. (2-colas)	-	0,220
	N	20	20
qPCR_UNR	Coeficiente de correlación	-0,287	1,000
	Sig. (2-colas)	0,220	-
	N	20	30

Nota. (P) < 0,01. IHC = Inmunohistoquímica

En el gráfico de correlación obtenido de casos y controles, se obtuvieron valores de R^2 que se alejan mucho de la unidad, por lo que indican claramente que no existe una correlación entre la expresión proteica y génica de UNR, ni en casos, ni

en controles, tal y como se observa en la figura 7. Además, al no existir un punto en el cual estas dos rectas intersecan, no existe relación entre la expresión proteica y génica en las muestras y controles analizados.

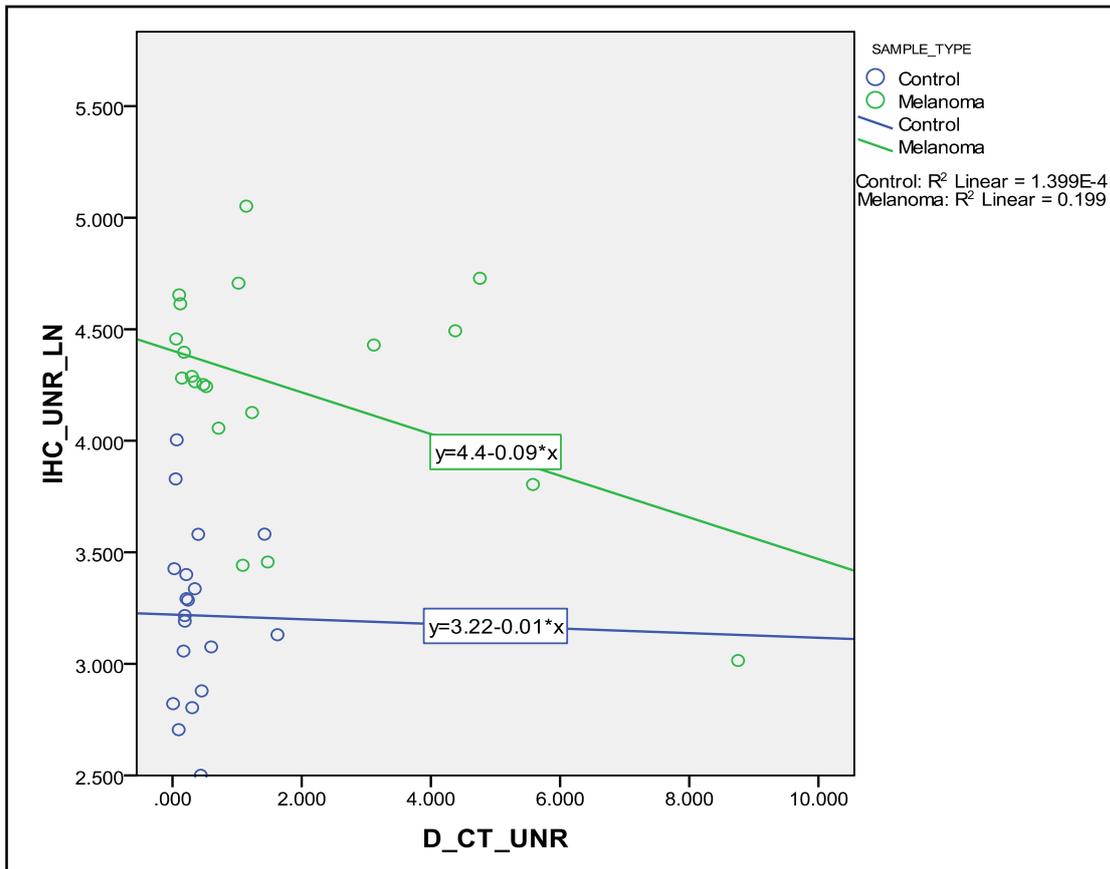


Figura 7. Relación entre la expresión proteica y génica de UNR. IHC_UNR_LN=Expresión proteica de UNR (Inmunohistoquímica). D_CT_UNR=Expresión génica de UNR (qPCR). No existe relación entre la expresión génica y proteica en los controles ni en las muestras analizadas, dado que no se observa una intersección entre las rectas. Los círculos representan a las muestras y a los controles analizados, mismos que no muestran un comportamiento normal, por lo que se observan R^2 alejados de la unidad.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Zhang, et al. (2015, pp. 789-797), quienes encontraron una relación entre la expresión de la proteína hepsina y las secuencias IRES de CDK11p58 en cáncer de próstata. Al parecer, la

hepsina está involucrada en la expresión de UNR, debido a que se une directamente a las secuencias IRES de UNR y suprime su actividad. Otros autores han encontrado que UNR regula la traducción de los transcritos dependientes de IRES que codifican el oncogén Myc, la quinasa PITSLRE y el regulador de apoptosis APAF-1 (Wurth, et al., 2016, pp. 1-14). Por tanto, las secuencias IRES pueden ser una clara explicación del porqué la expresión proteica y génica de UNR no se correlacionan.

5.7. Relación entre la proteína UNR y los cinco ARNm diana

Una vez obtenidos los resultados de la expresión de UNR mensajero y los ARNm diana, candidatos a encontrarse regulados por dicha proteína, se realizó un análisis utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). En el análisis se encontró una relación entre UNR y TGFBI, GUS β Y S100A10, que indica que esta proteína puede estar regulando la expresión de dichos mensajeros.

Tabla 11.

Correlación de la expresión de UNR con los ARNs mensajeros diana.

Rho de Spearman		UNR
PTEN	Coeficiente de correlación	0,161
	Sig. (2-colas)	0,223
	N	59
TGFBI	Coeficiente de correlación	0,302 [*]
	Sig. (2-colas)	0,020
	N	59
GUSβ	Coeficiente de correlación	0,474 ^{**}
	Sig. (2-colas)	0,000
	N	59
S100A10	Coeficiente de correlación	0,410 ^{**}
	Sig. (2-colas)	0,001
	N	59
SERPINE1	Coeficiente de correlación	0,252
	Sig. (2-colas)	0,055

	N	59
--	---	----

Nota. *La correlación es significativa cuando $p < 0.05$. **La correlación es significativa cuando $p < 0.01$. Dos colas.

La investigación realizada por (Wurth, et al., 2016, pp. 1-14) determinó *in silico* que existen alrededor de 1532 ARNs mensajeros diana de UNR, de los cuales 396 están asociados con cáncer. Las cinco dianas seleccionadas en esta investigación están incluidas en este último grupo. Sin embargo, en nuestra investigación se ha encontrado que tan solo tres de los cinco ARNs diana seleccionados están relacionados con la expresión de UNR y por tanto, pueden estar regulados por esta proteína

El TGF- β -Inducido (TGFBI), es una proteína que está asociada con el melanoma. Está involucrada en los procesos de crecimiento tumoral y en metástasis (Lauden, et al., 2014). La única relación que se había encontrado entre TGFBI y UNR es la descrita por (Wurth, et al., 2016, pp. 1-14), a en un estudio *in silico*. Por lo que esta es la primera vez que se ha encontrado dicha relación en muestras clínicas. Muchas investigaciones indican que TGFBI trabaja como un supresor tumoral (Ween, Oehler, & Ricciardelli, 2012, pp. 10465-10467; Nummela, et al., 2012, pp. 1666-1669; Laudén, et al., 2014, pp. 1677-1678); sin embargo, en esta investigación se ha encontrado mayor expresión en muestras tumorales, por lo que podría considerarse un protooncogén en melanoma (Tabla 4).

Al igual que TGFBI, la única relación descrita hasta el momento entre UNR y GUS β , y entre UNR y S100A10 es la encontrada en el estudio *in silico* (Wurth, et al., 2016, pp. 5-6). Por lo que nuestra investigación es la primera en la que se ha encontrado una relación entre UNR y estos ARNs mensajeros, en muestras clínicas. GUS β (β -Glucuronidasa) es una proteína que está involucrada en procesos cancerígenos, y al igual que P53 o PTEN, ha sido propuesto como un supresor tumoral (Regina, et al., 2008, p. 1032). Mientras que S100A10 ha sido

descrita como una proteína que juega un rol importante en la progresión tumoral, así como en la tumorigénesis, en varios tipos de cáncer, incluido el melanoma (Leclerc, Heizmann, & Vetter, 2009, pp. 65-75). Estos resultados sustentan los encontrados en esta investigación, donde se encontró una mayor expresión de Gus β en muestras de tejido sano que en muestras tumorales, mientras que ocurrió lo contrario para S100A10 (Tabla 4). Estos resultados sugieren que Gus β está actuando como un supresor tumoral, mientras que S100A10 funciona como protooncogén.

5.8. Relación de UNR con variables demográficas e histológicas

Con el propósito de obtener datos en cuanto a la relación entre las variables: edad, género, estadio del tumor primario (pT), nódulos (N), metástasis (M), tipo histológico, y la expresión de UNR, se realizó un análisis de correlación. Debido a que los resultados anteriores indican que existe una diferencia en cuanto a la expresión de PTEN en muestras tumorales y tejido sano, se optó por realizar el análisis de correlación con los ARNs mensajeros de PTEN y UNR. El análisis arrojó una relación entre la edad y la expresión de PTEN, así como entre el tipo histológico, y la expresión de PTEN y UNR. En cuanto a la variable "Metástasis", ninguno de los pacientes analizados presentaba en su historia clínica la aparición de esta; en el 100% de los casos se encontraba como "no valorable", razón por la cual no se pudo incluir esta variable en el análisis estadístico.

Los estudios realizados por varios autores han determinado que la mayor parte de los casos diagnosticados de melanoma se reportan pasados los 59 años (Leitner, 2006, pp. 86-97) . Por tanto, las investigaciones previas corroboran los datos de este trabajo, en el que hemos encontrado que el promedio de edad de los pacientes evaluados es de 73 años. Considerando que PTEN es un supresor tumoral (Song, Salmena, & Pandolfi, 2012, pp. 285-287; Dillon & Miller, 2014, pp. 65-79; Yamada & Araki, 2001, pp. 2375-2382), los resultados relacionados con la

aparición de melanoma y la edad podrían indicar que existe una alteración en cuanto a la expresión de PTEN en personas de la tercera edad y por ende, una mayor tasa de morbilidad en este grupo de individuos.

Por otro lado, la mayor parte de los pacientes evaluados presenta tumores de más de 4mm (70%), estos datos no se corresponde con los porcentajes encontrados por Marcoval, et al. (2008, pp. 464-468), quienes determinaron que el mayor porcentaje de personas presenta melanomas menores a 1mm. En vista de que mientras más grande es el tumor, mayor cantidad de células cancerosas se encuentran en el mismo, es probable que la expresión de los protooncogenes aumente mientras que la de los supresores tumorales disminuya. Considerando que UNR ha sido definido como protooncogén en este estudio, se espera que la expresión de este sea directamente proporcional a la progresión del melanoma, mientras que la expresión de PTEN sea inversamente proporcional a desarrollo de esta neoplasia. Estos resultados se pueden observar en la tabla 12.

5.9. Estandarización de PCR en tiempo real (qPCR)

Dado que se utilizaron varios protocolos para obtener los mejores resultados, se estableció un protocolo de qPCR con el cual se obtuvo la mayor expresión de los ARNm y las curvas de disociación óptimas para cada par de cebadores. Así, se obtuvieron dos protocolos, uno para el ARNm PTEN (Tabla 2), y otro para los ARNs mensajeros restantes (GAPDH, CSDE1, TGFBI, GUS β , S100A10 y SERPINE1) (Tabla 3).

Tabla 12.

Contraste de la expresión de UNR y PTEN con variables demográficas e histológicas

Rho de Spearman		UNR	PTEN
EDAD	Coeficiente de correlación	0,108	-0,289*
	Sig. (bilateral)	0,416	0,027
	N	59	59
GENERO	Coeficiente de correlación	-0,144	-0,052
	Sig. (bilateral)	0,277	0,695
	N	59	59
TUMOR PRIMARIO (pT)	Coeficiente de correlación	0,277*	-0,093
	Sig. (bilateral)	0,034	0,482
	N	59	59
NÓDULOS (N)	Coeficiente de correlación	0,044	-0,094
	Sig. (bilateral)	0,741	0,481
	N	59	59
TIPO HISTOLÓGICO	Coeficiente de correlación	-0,274*	0,298*
	Sig. (bilateral)	0,035	0,022
	N	59	59
METÁSTASIS (M)	Coeficiente de correlación	++	++
	Sig. (bilateral)	++	++
	N	59	59

Nota. *La correlación es significativa cuando $p < 0.05$. **La correlación es significativa cuando $p < 0.01$. Dos colas. ++Todos los casos presentaban el mismo tipo de metástasis, por lo que no se obtuvieron resultados estadísticos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La expresión proteica de UNR presenta diferencias significativas al comparar el tejido tumoral y tejido sano.

No existen diferencias significativas en la expresión relativa de UNR en tejido canceroso y tejido sano.

Los resultados de la expresión del ARNm PTEN obtenidos corroboran estudios realizados anteriormente en los cuales se indica que actúa como un supresor de tumores.

La disminución de la expresión de ARNm PTEN es más notable en muestras que se encuentran en estadios avanzados de la progresión tumoral.

Los ARNs mensajeros GUS β , TGFBI, SERPINE1 Y S100A10 no presentaron una expresión significativa en melanoma.

El ARNm S100A10 no presenta diferencias significativas de expresión entre los controles y melanoma.

6.2. Recomendaciones

Realizar el estudio con un mayor número de muestras, con el fin de obtener resultados más consistentes desde el punto de vista estadístico.

Se recomienda considerar la edad como un indicador importante a la hora de elegir la muestra y el grupo control, para garantizar que la variabilidad en la expresión no esté influenciada por este factor.

Ampliar el estudio de UNR a otros tipos de cáncer y en otras poblaciones.

Validar de forma experimental la regulación de UNR hacia posibles genes blanco encontrados previamente en análisis *in silico*, con el objetivo de determinar posibles dianas terapéuticas en el melanoma.

REFERENCIAS

- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Olvera, B., & Chánez, M. (2008). *PCR en tiempo real*. Recuperado el 27 de Mayo de 2016, de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcrtiempo.pdf>
- Ashton-Prolla, P., Bakos, L., Junqueira, G., Giugliani, R., Azevedo, S., & Hogg, D. (2007). Clinical and Molecular Characterization of Patients at Risk for Hereditary Melanoma in Southern Brazil. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Bastidas, L., & Guaman, J. (2013). *Características socio-epidemiológicas del melanoma en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca durante el período 2000 - 2008*. Quito.
- Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., & Gandini, S. (2012). Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Medicine*.
- Burgues, M., & Lllamas, R. (2011). *Factores de Riesgo y detección temprana del melanoma maligno en pacientes con nevus melanocítico*. Madrid: Cáncer y control.
- Cueva, P., & Yépez, J. (2009). *Epidemiología del Cáncer en Quito 2003-2005*. Quito: SOLCA.
- Dako. (2009). *Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition*. Recuperado el 27 de Mayo de 2016, de http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main_pages/timetable/lectures/2008%20Lectures/Immunology.DAKO.pdf#page=55
-

- Dako. (s.f.). *EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus)*.
Obtenido de <http://www.dako.com/dist/download.pdf?objectid=114786005>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quiantification of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, doi:10.3791/2565.
- Dillon, L., & Miller, T. (2014). Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function. *Current Drug Targets*.
- Elnifro, E., Ashshi, A., & Cooper, R. (2000). Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Erdei, E., & Torres, S. (2010). A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*.
- ESMO. (2013). *Melanoma: una guía para pacientes*. Recuperado el 6 de Junio de 2016, de <https://www.esmo.org/content/download/6617/115125/file/ES-Melanoma-Guia-para-Pacientes.pdf>
- Faizal, M. (1995). Cáncer de piel. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*.
- Fuhrich, D., Lessey, B., & Savaris, R. (2013). Comparison of HSCORE Assessment of Endometrial $\beta 3$ Integrin Subunit Expression with Digital HSCORE Using Computerized Image Analysis (ImageJ). *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*.
- Goel, V., Lazar, A., Warneke, C., Redston, M., & Haluska, F. (2006). Examination of Mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. *Investigative Dermatology*.
- González, M., Vernhes, M., & Sánchez, A. (2009). La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, 18.

Guerra, P., & Yepez, J. (2014). Epidemiología del cáncer en Quito 2006-2010. Quito: SOLCA.

Heidenreich, B., Nagore, E., Rachakonda, S., García-Casdo, Z., Requena, C., Traves, V., . . . Kumar, R. (2014). Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nature communications*, 1-7.

Instituto Nacional del cáncer. (05 de Febrero de 2016). *Cáncer de piel: tratamiento (PDQ®)-Versión para profesionales de salud*. Obtenido de http://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/pro/tratamiento-piel-pdq#link/_187_toc

Invitrogen. (2010). *ThermoFisher Scientific*. Obtenido de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/superscriptII_pps.pdf

Lauden, L., Siewiera, J., Boukouaci, W., Ramgolam, K., Mourah, S., Lebde, C., . . . Al-Daccak, R. (6 de Febrero de 2014). TGF- β -Induced (TGFBI) Protein in Melanoma: A Signature of High Metastatic Potential. *Journal of Investigative Dermatology*.

Lauden, L., Siewiera, J., Boukouaci, W., Ramgolam, K., Mourah, S., Lebde, C., . . . Al-Daccak, R. (2014). TGF- β -Induced (TGFBI) Protein in Melanoma: A Signature of High Metastatic Potential. *Journal of Investigative Dermatology*.

Leclerc, E., Heizmann, C., & Vetter, S. (2009). RAGE and S100 protein transcription levels are highly variable in human melanoma tumors and cells. *General Physiology and Biophysics*.

Leitner, R. (2006). Epidemiología del melanoma cutáneo. *Revista argentina de dermatología*, 87(2).

- Marcovál, J., Moreno, A., Torras, A., Baumann, E., Graells, J., & Gallego, M. (2008). Evolución del melanoma maligno cutáneo en los últimos 19 años en un hospital terciario de la cuenca mediterránea. *Actas Dermo-Sifiliológicas*.
- National Institute of Mental Health. (s.f.). *Research Service Branch*. Obtenido de <https://imagej.nih.gov/index.html>
- NCBI. (s.f.). *Primer-BLAST*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/#>
- NIKON. (2016). *NIKON INSTRUMENTS*. Obtenido de https://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Productos/Microscopios-verticales
- Norgaard, C., Glud, M., & Gniadecki, R. (2011). Are All Melanomas Dangerous? *Más dermatología*.
- Nummela, P., Lammi, J., Soikkeli, J., Saksela, O., Laakkonen, P., & Hölttä, E. (2012). Transforming Growth Factor Beta-Induced (TGFBI) Is an Anti-Adhesive Protein Regulating the Invasive Growth of Melanoma Cells. *The American Journal of Pathology*.
- OMS. (2009). *Las radiaciones ultravioleta y la salud humana*. Obtenido de https://www.mutual.cl/Portals/0/novedades/lb_novedades_radiacion/radiacion_uv_OMS.pdf
- Organización Mundial de la Salud. (2015). *Cáncer*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Priario, J. (2005). Historia del melanoma maligno en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*.
- Promega. (s.f.). *GoTaq® qPCR Master Mix*. Obtenido de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/gotaq%20qpcr%20master%20mix%20protocol.pdf>

- Raclet, D., Sablon, J., Markovist, J., Malato, Y., Huet, S., Lagarde, P., & Mountaudon, D. (2007). Unr, a cytoplasmic RNA-binding protein with cold-shock domains, is involved in control of apoptosis in ES and HuH7 cells. *Nature*.
- Regina, S., Valentin, J., Lachot, S., Giraudeau, B., Rollin, J., & Gruel, Y. (2008). Alterations of P53 and PTEN Genes Are Associated with Increased TF Expression and Reduced Survival in Non Small Cell Lung Cancer. *Blood*, 112(11).
- Riley, P. (2003). Melanogenesis and Melanoma. *Pigment Cell Research*.
- Robertson, G., Coleman, A., & Lugo, T. (1996). A Malignant Melanoma Tumor Suppressor on Human Chromosome 11. *Cancer Research*, 4487-4492.
- Roche. (2016). *Life Science*. Obtenido de <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/5b7a8637-3ebc-e411-a8af-00215a9b0ba8>
- Rouhani, P., HU, S., & Kirsner, R. (2009). Melanoma in Hispanic and Black Americans. *Cancer control*, 15(3).
- Saldivar, C., Castellero, C., & López, C. (1998). Melanoma acral lentiginoso. *Rev. Inst. Nac. Cancerol. (Méx)*, 44(4).
- Schepens, B., A Tinton, S., Bruynooghe, Y., Parthoens, E. H., Beyaert, R., & Cornelis, S. (1 de Noviembre de 2007). A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. *THE EMBO*, 26.
- Schmittgen, T., & Kenneth, L. (2008). Analazyng real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*.
- Serafina, A., Bbalestrieri, E., Pierimarchi, P., Matteucci, C., Moroni, G., Oricchio, E., . . . Mastino, A. (2009). The activation of human endogenous retrovirus K

(HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Experimental cell reseach* .

SOLCA. (2010). *Asas estandarizadas de los principales tipos de cáncer según registro de tumores en hombres y mujeres*. Recuperado el 3 de Junio de 2016, de <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/reportes/Tablas2-2.jsp>

Song, M., Salmena, L., & Pandolfi, P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Molecular Cell Biology*.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., & Rozen, S. (2007). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e:115.

Varghese, F., Burhari, A., Malhotra, R., & De, A. (2014). IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLOS ONE*, 9(5). doi: 10.1371

Ween, M., Oehler, M., & Ricciardelli, C. (2012). Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFB1)/(β ig-H3): A Matrix Protein with Dual Functions in Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13.

Weeraratna, A., & Gorospe, M. (2016). UNRelenting Translation UNRestrains Melanoma Migration. *Cancer cell*.

Whiteman, D., Zhou, X.-P., Cummings, M., Pavey, S., Hayward, N., & Eng, C. (2002). NUCLEAR PTEN EXPRESSION AND CLINICOPATHOLOGIC FEATURES IN A POPULATION -BASED SERIES OF PRIMARY CUTANEOUS MELANOMA. *International Journal of Cancer*.

Wolf, K., Goldsmith, L., Katz, S., Gilchrest, B., & Paller, A. (2009). *Dermatología en medicina general* (7ma ed.). Buenos Aires: Panamericana.

- World Health Organization (WHO). (2006). *Pathology and genetics of tumours of the skin*. (P. LeBoit, W. Burg, D. Weedon, & A. Sarasain, Edits.) Lyon: IARC Press.
- Wurth, L., & Gebauer, F. (2015). RNA-binding proteins, multifaceted translational regulators in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Wurth, L., Papasaikas, P., Olmeda, D., Bley, N., Calvo, G., Guerrero, S., . . . Gebauer, F. (2016). UNR/CSDE1 Drives a Post-transcriptional Program to Promote Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer Cell*, 30.
- Yamada, K., & Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science*.
- Zhang, C., Zhang, M., Wu, Q., Peng, J., Ruan, Y., & Gu, J. (2015). Hepsin inhibits CDK11p58 IRES activity by suppressing unr expression and eIF-2 α phosphorylation in prostate cancer. *Cellular Signalling*.

ANEXOS

Tabla 13. Expresión de la proteína UNR en muestras de nevus obtenidas por el software ImageJ

Expresión de UNR en NEVUS			
	Muestra	Mean DAB intensity	$f=255-i^*$
1	1N_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	240,054	14,946
2	1N_10X_IHC.4.jpg-(Colour_2)	212,799	42,201
3	1N_40X_IHC.5.jpg-(Colour_2)	242,815	12,185
4	2N_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	231,002	23,998
5	2N_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	234,236	20,764
6	2N_40X_IHC.4.jpg-(Colour_2)	229,632	25,368
7	3N_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	228,356	26,644
8	3N_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	233,725	21,275
9	3N_40X_IHC.5.jpg-(Colour_2)	224,4	30,6
10	4N_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	237,382	17,618
11	4N_10X_IHC.4.jpg-(Colour_2)	227,558	27,442
12	4N_40X_IHC.7.jpg-(Colour_2)	220,827	34,173
13	5N_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	230,866	24,134
14	5N_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	232,797	22,203
15	5N_40X_IHC.6.jpg-(Colour_2)	232,511	22,489
16	6N_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	242,344	12,656
17	6N_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	201,394	53,606
18	6N_40X_IHC.4.jpg-(Colour_2)	236,127	18,873

Tabla 14. Expresión de la proteína UNR en muestras de melanoma obtenidas por el software ImageJ

Expresión de UNR en MELANOMA			
	Muestra	Mean DAB intensity	f=255-i*
1	1T_4X_IHC.2.jpg-(Colour_2)	253,176	1,824
2	1T_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	144,339	110,661
2	1T_40X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	147,339	114,861
3	2T_4X_IHC.1 (1).jpg-(Colour_2)	185,376	69,624
4	2T_10X_IHC.2.jpg-(Colour_2)	165,623	89,377
5	2T_40X_IHC.3 (1).jpg-(Colour_2)	140,187	114,813
7	3T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	237,121	17,879
8	3T_10X_IHC.2.jpg-(Colour_2)	211,765	43,235
9	3T_40X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	201,107	53,893
15	4T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	197,005	57,995
17	4T_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	124,61	130,39
19	4T_40X_IHC.5.jpg-(Colour_2)	98,712	156,288
20	5T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	193,216	61,784
22	5T_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	173,822	81,178
23	5T_40X_IHC.4.jpg-(Colour_2)	182,683	72,317
24	6T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	227,252	27,748
26	6T_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	201,394	53,606
28	6T_40X_IHC.5.jpg-(Colour_2)	196,519	58,481
29	7T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	226,329	28,671
30	7T_10X_IHC.2.jpg-(Colour_2)	241,927	13,073
31	7T_40X_IHC.4.jpg-(Colour_2)	254,044	0,956
32	8T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	235,587	19,413
34	8T_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	216,389	38,611
36	8T_40X_IHC.5.jpg-(Colour_2)	200,185	54,815
38	9T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	226,36	28,64
40	9T_10X_IHC.3.jpg-(Colour_2)	191,688	63,312
42	9T_40X_IHC.5.jpg-(Colour_2)	149,743	105,257
44	10T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	223,298	31,702
45	10T_10X_IHC.2.jpg-(Colour_2)	193,053	61,947
45	10T_40X_IHC.2.jpg-(Colour_2)	183,053	71,947
46	11T_4X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	197,389	57,611
47	11T_10X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	187,232	67,768
48	11T_40X_IHC.1.jpg-(Colour_2)	168,158	86,842

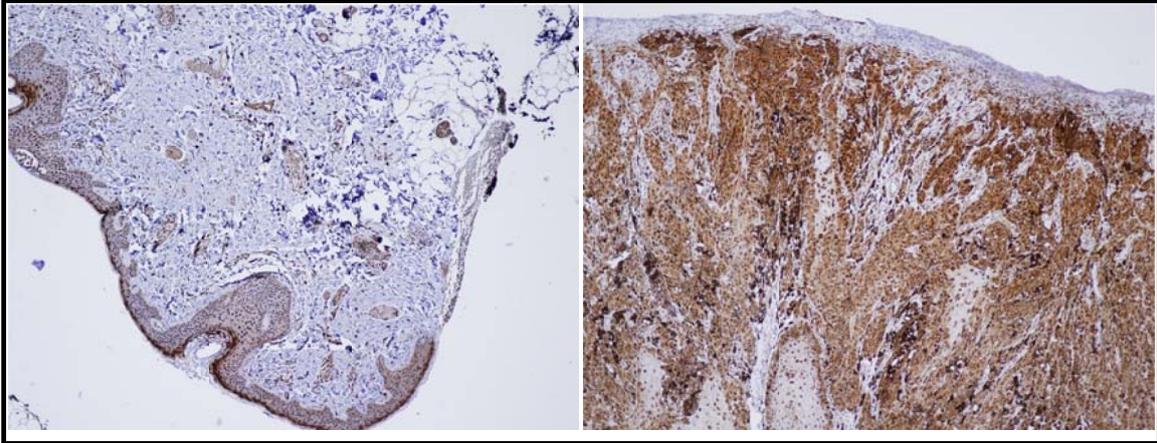


Figura 8. Tinción inmunohistoquímica observada al microscopio, magnificación 4X. A la izquierda: tejido sano (nevus), a la derecha: tejido canceroso (paciente con melanoma).

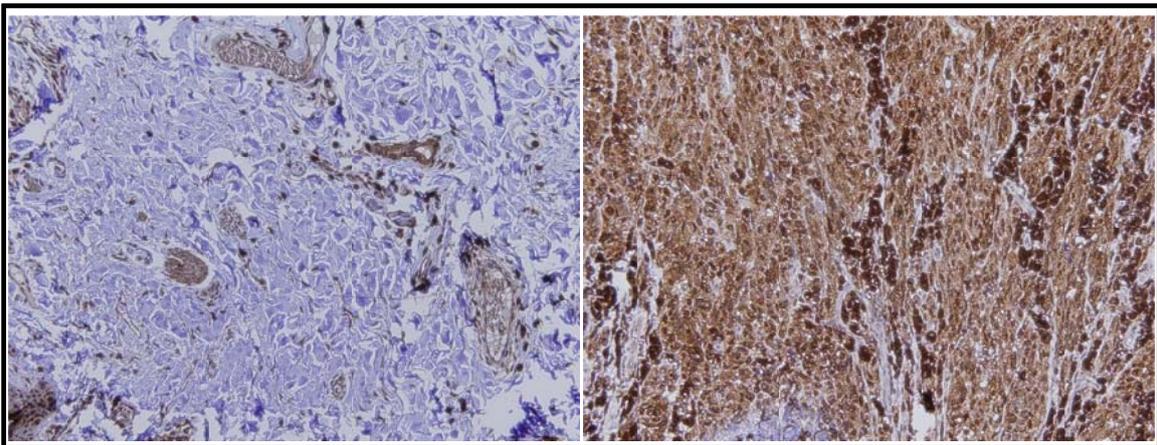


Figura 9. Tinción inmunohistoquímica observada al microscopio, magnificación 10X. A la izquierda: tejido sano (nevus), a la derecha: tejido canceroso (paciente con melanoma).

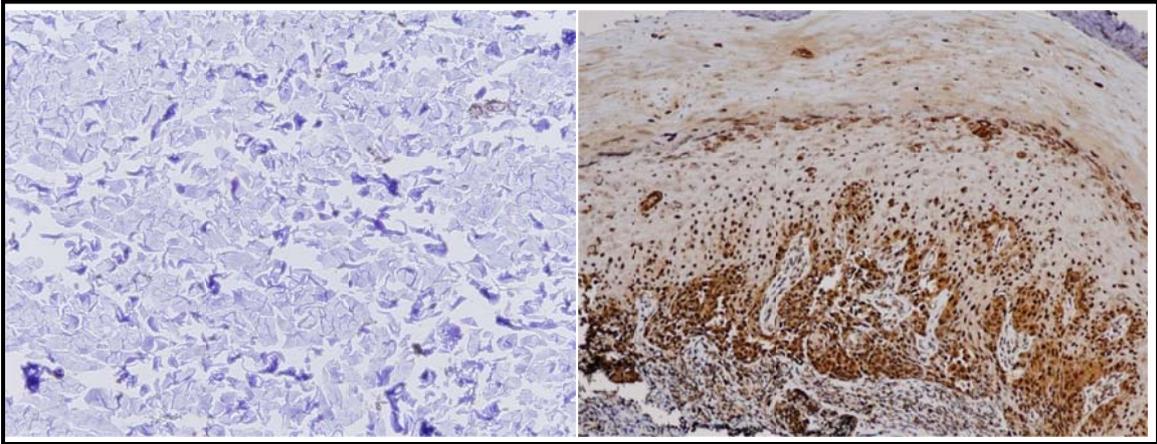


Figura 10. Tinción inmunohistoquímica observada al microscopio, magnificación 40X. A la izquierda: tejido sano (nevus), a la derecha: tejido canceroso (paciente con melanoma).

