



Expresión del citocromo p450 1A1 en enfermedad tumoral de tiroides

RESUMEN

Antecedentes: la enfermedad tumoral de tiroides es común, con prevalencia mundial de nódulos de 5% en mujeres y 1% en hombres; de 5 a 15% de los nódulos son malignos. Es la causa más común de cirugía de cuello en el Hospital Central Militar. El citocromo p450 (CYP) es una superfamilia de enzimas, importante en el metabolismo de tóxicos y fármacos, que presumiblemente activa carcinógenos; el CYP 1A1, inducido por hidrocarburos aromáticos, está asociado con cáncer. Los estudios de nódulos tiroideos, enfermedad tumoral benigna y cáncer no han tenido conclusiones definitivas.

Objetivo: verificar si la expresión del gen CYP1A1 está sobrerregulada en la enfermedad tumoral de tiroides maligna respecto a la enfermedad benigna.

Material y método: estudio observacional, transversal, descriptivo y analítico en el que se recolectaron 64 muestras de tejido, 32 de enfermedad maligna y 32 de benigna; se extrajo ARN (con reactivo Trizol) y se verificó su integridad; se realizó reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (PCR-RT) para la expresión génica de CYP 1A1 y se aplicó estadística.

Resultados: se extrajo ARN de 64 muestras, se realizó PCR-RT, con 59 muestras finales; en el análisis estadístico se obtuvo $p=0.3048$, que si bien no es estadísticamente significativa, corroboró una sobreexpresión relativa del CYP 1A1 en enfermedad maligna *versus* benigna (factor=1.968), lo que confirmó nuestra hipótesis.

Conclusiones: hipotetizamos una sobreexpresión de CYP 1A1 en enfermedad tiroidea, y esto se comprobó, porque la expresión génica está aumentada respecto al gen endógeno GAPDH (glutaraldehído, fosfato deshidrogenasa), en la enfermedad maligna y en la benigna; aun sin una diferencia significativa entre éstas, existe sobreexpresión relativa numérica de CYP 1A1 en la enfermedad maligna. Se requiere mayor investigación en genómica de la enfermedad tumoral de cabeza y cuello.

Palabras clave: tumores de tiroides, cáncer de tiroides, citocromo P450 CYP 1A1, expresión génica.

Expression of cytochrome p450 1A1 in thyroid tumoral disease

ABSTRACT

Background: Thyroid tumor pathology is common, with a worldwide prevalence of nodules of 5% in women and 1% in males, 5 to 15% are malignant; is the most common cause of neck surgery at the Central Military Hospital. Cytochrome P450 (CYP) superfamily of enzymes is

José Antonio Gallegos-Vargas¹
Adelaido López-Chavira²
Esaú Floriano-Sánchez³
César Gamaliel Rivera-Martínez⁴
Dolores Ronquillo-Sánchez⁵
Berenice Prestegui-Martel⁶
Jaime Sánchez-Roldán⁸
Allá Mellnyk⁷

¹ Otorrinolaringólogo y cirujano de Cabeza y Cuello.

² Otorrinolaringólogo y cirujano oncólogo de Cabeza y Cuello. Jefe de curso de Orl y CCC.

³ Doctor en biología molecular. Subdirector de investigación.

⁴ Otorrinolaringólogo y cirujano oncólogo de Cabeza y Cuello, adscrito al servicio de Orl y CCC.

⁵ Estancia posdoctoral en biología molecular.

Hospital Central Militar. Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México, DF. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

⁶ Maestro en biología molecular, estudiante de doctorado.

⁷ Médico general, estudiante de maestría.

Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

⁸ Otorrinolaringólogo y cirujano de Cabeza y Cuello, jefe del servicio de Orl y CCC del Hospital Militar Regional de Especialidades, Monterrey, Nuevo León, México.

Recibido: 29 de enero 2015

Aceptado: 18 de abril 2015

Correspondencia: Mayor MC José Antonio

Gallegos Vargas

Nardo 21

53680 Naucalpan de Juárez, Estado de México,

México

edrnotorious_pop@hotmail.com

Este artículo debe citarse como

Gallegos-Vargas JA, López-Chavira A, Floriano-Sánchez E, Rivera-Martínez CG y col. Expresión del citocromo p450 1A1 en enfermedad tumoral de tiroides. An Orl Mex 2015;60:140-157.



important in the metabolism of drugs and toxic, presumably active carcinogens. The CYP 1A1 induced by aromatic hydrocarbons has been associated with cancer; studies in thyroid nodules, benign tumor pathology and cancer have not had any definite conclusions.

Objective: To verify if the expression of CYP1A1 gene is over-regulated in malignant thyroid disease regarding benign.

Material and method: An observational, cross-sectional, descriptive and analytical study in which 64 tissue samples were collected, 32 of malignant disease, 32 of benign disease; RNA (Trizol) was extracted and its integrity was verified; RT-PCR was performed for gene expression of CYP 1A1, statistical was applied.

Results: RNA was extracted from 64 samples, RT-PCR was performed, with n=59 final; in statistical analysis $p=0.3048$ was obtained, although not statistically significant, an over-expression of CYP 1A1 relative in malignant *versus* benign (factor=1.968) was confirmed, confirming our hypothesis.

Conclusions: We hypothesize an over-expression of CYP 1A1 in thyroid pathology, this was verified, gene expression is increased relative to the endogenous gene GAPDH, both malignancy and benign; even without a significant difference between these, there is a numeric over-expression on CYP 1A1 in malignancy. Much more research is needed in genomic tumor disease of head and neck.

Key words: thyroid tumors, thyroid cancer, cytochrome P450 CYP 1A1, gene expression.

ANTECEDENTES

Los nódulos tiroideos son muy comunes; con el advenimiento de técnicas de imagen más sensibles ha aumentado su incidencia; de acuerdo con las guías de la Academia Americana de Tiroides (ATA), un nódulo clínicamente palpable tiene prevalencia mundial de hasta 5% en mujeres y 1% en hombres, y aumenta 19-67% con ayuda de ultrasonido de alta resolución.¹ En un estudio realizado en el Valle de México, en 2011, con 2,401 sujetos, de los que 82% eran mujeres, se identificó una prevalencia por palpación de 1% (34 nódulos) y por ultrasonido de 20% (471 nódulos).² La importancia clínica de los nódulos tiroideos recae en la necesidad de excluir el cáncer de tiroides, que representa 5 a 15% del

universo de nódulos tiroideos, dependiendo de la edad, el sexo, los antecedentes de exposición a radiación, antecedentes familiares y diversos factores, sobre todo ambientales. La prevalencia se incrementa con la edad y es más común en mujeres que en hombres.³ La enfermedad tiroidea, benigna y maligna, es susceptible de ser tratada quirúrgicamente, la existencia de un nódulo tiroideo *per se* no es indicación de cirugía. En el servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar de la Ciudad de México se consideran principalmente las guías actualizadas de la ATA de 2009 para establecer un plan de diagnóstico y tratamiento. Aunque no se tiene una estadística actualizada y reportada, se sabe que la cirugía de tiroides es la cirugía de cabeza y cuello que ocupa el pri-

mer lugar en incidencia en nuestro servicio. De acuerdo con reportes previos de nuestro hospital, la incidencia de tumores tiroideos difiere de otras series, pues se reporta una relación mujer:hombre de incluso 9.8:1; en cuanto a la condición oncológica, en un periodo de cuatro años, 63% de toda la afección quirúrgica fue benigna y 37%, maligna; por estirpe histológica, la afección benigna más frecuente es el bocio nodular y multinodular (81%) y en afección maligna es el carcinoma papilar (64%). La cirugía más realizada contra tumores benignos es la hemitiroidectomía, en 74% de los casos, y contra tumores malignos, la tiroidectomía total con o sin disección de cuello, en 86% de los casos.⁴

El cáncer de tiroides bien diferenciado, que incluye al cáncer papilar y al folicular, comprende la mayor parte de todas las malignidades de tiroides, hasta en 90%.⁵

Los citocromos P450 son miembros de una superfamilia de hemoproteínas de peso de 50 kDa, que activan dioxígeno para catalizar la oxidación de hidrocarburos inactivados.⁶ Actúan en un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas; forman parte de las cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes; constituyen el mayor complejo enzimático involucrado en el metabolismo de los fármacos en nuestro organismo al tener un papel fundamental en la fase oxidativa del metabolismo (fase I).⁷ Los citocromos P450 son enzimas clave en el metabolismo de procarcinogénicos en carcinogénicos, así como en diversidad de medicamentos antineoplásicos al tener participación en la evolución tumoral y en la respuesta del tumor al tratamiento.⁸

El CYP 1A1 es una enzima extrahepática; es el citocromo extrahepático más común; su expresión constitutiva es muy baja, pero es muy inducible por ligandos del receptor Ah, como hidrocarburos

aromáticos policíclicos, como en el humo del tabaco. La enzima CYP1A1 es la más activa entre los citocromos en metabolizar procarcinogénicos, particularmente hidrocarburos en compuestos intermedios altamente reactivos; al unirse éstos al ADN forman aductos y contribuyen a la carcinogénesis.⁹ Su nombre oficial por convención mundial es citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1, otorgado por el HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*).¹⁰

Tienen un papel importante en la activación de algunos procarcinogénicos, convirtiéndolos en metabolitos intermediarios que pueden unirse al ADN y originar mutaciones. Los polimorfismos del citocromo P450 1A1 se han estudiado ampliamente y están asociados con diversos tipos de enfermedad tumoral, sobre todo en relación con el cáncer de pulmón.¹¹ Beresford, en 1993, se preguntó si el CYP1A1 es un amigo o enemigo en la evolución del cáncer, y comentó que se ha expuesto a una prensa desacreditadora existiendo evidencia contradictoria.¹²

En lo que respecta a la asociación entre CYP1A1 y la enfermedad tumoral de tiroides, no existe evidencia de peso al respecto que aclare el panorama, puesto que la asociación de exposición a hidrocarburos y tabaco tampoco está establecida. En un estudio brasileño de 2010 se intentó aclarar la susceptibilidad de resultar con nódulos tiroideos asociada con la expresión de genes, entre ellos CYP1A1; los resultados genotípicos mostraron polimorfismos predominantes en tiroides CYP1A1 m1 y CYP1A1 m2, en casos y en controles, sin diferencia estadística significativa de expresión, y no se comprobó una asociación directa con la evolución de la enfermedad.¹³

En un reciente reporte ruso de la primavera de 2014 se analizaron polimorfismos para diversos genes en enfermedad tiroidea en general; el análisis de CYP1A1, CYP1A2, TPO y DIO2 se realizó en mujeres de una industria, entre no afectadas



y un grupo con enfermedad tiroidea; se reportó asociación de CYP1A1 con bocio nodular y de CYP1A2 con tiroiditis autoinmunitaria.¹⁴ Otro estudio ruso acerca de la existencia de nódulos tiroideos y nódulos reproductivos en mujeres dedicadas a la industria de hidrocarburos sugiere que la exposición ocupacional a manejos industriales peligrosos aumenta el riesgo de la expresión de los genes estudiados, entre ellos CYP1A1, y con esto, resultar con enfermedad tiroidea y reproductiva.¹⁵ Respecto a la afección maligna, un estudio de 2008, efectuado en población saudí, reporta un incremento en el riesgo de cáncer de tiroides en sobreexpresión de CYP1A1 y GSTT1.¹⁶ Finalmente, otro estudio brasileño de 2009 no encontró algún efecto aditivo ni efectos combinados con otros genes de riesgo de cáncer de tiroides para CYP1A1.¹⁷

El objetivo de este estudio fue determinar y analizar el perfil de expresión génica relativa del CYP1A1 en tejidos tumorales de tiroides malignos contra benignos.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio observacional, transversal, descriptivo y analítico, con pacientes mexicanos con diagnóstico de enfermedad tumoral de tiroides quirúrgica, benigna o maligna, que fueron captados y operados en el servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar de la Ciudad de México. Se tomó una muestra del tejido tiroideo, obtenido como producto, ya sea de tiroidectomía parcial o total. Los tejidos se clasificaron en los diferentes tipos histológicos por el departamento de Patología del Hospital Central Militar; con base en lo anterior se formaron dos grupos: uno de afección maligna y otro de afección benigna, que se tomó como el grupo control.

Se capturaron 26 muestras en un primer periodo, comprendido de enero a noviembre de 2012

(grupo piloto) y se conjuntaron con 38 muestras obtenidas entre noviembre de 2013 y octubre de 2014, con 64 muestras de tejido inicialmente llevadas para su análisis; sin embargo, cinco muestras se eliminaron durante la etapa de experimentación, obteniéndose finalmente 59 resultados de expresión, 30 del grupo de enfermedad maligna y 29 del grupo control (enfermedad benigna).

Se seleccionaron para participar en el estudio todos los pacientes a ser operados de alguna variedad de tiroidectomía en los periodos mencionados y que firmaron su consentimiento, de los que se obtuvo una muestra satisfactoria de tejido de tiroides.

Criterios de inclusión

Se incluyeron 38 muestras de tiroides obtenidas del mismo número de pacientes sometidos a tiroidectomía total o parcial en el Hospital Central Militar de la Ciudad de México, en el periodo comprendido de noviembre de 2013 a noviembre de 2014. Se incluyeron 26 muestras de tiroides obtenidas de pacientes participantes en el estudio piloto, en el periodo comprendido de enero a noviembre de 2012; todos los pacientes firmaron su consentimiento válidamente informado.

Criterios de exclusión

Se excluyeron seis pacientes captados inicialmente en la clínica, pero por diversas razones no se obtuvo la muestra de tiroides en fresco en quirófano.

Criterios de eliminación

Se eliminaron cinco pacientes durante el periodo de experimentación, dos de ellos debido a que durante la etapa de replicación de ADN en PCR-RT no se obtuvo una replicación, y tres más debido

a que no tuvieron expresión adecuada del CYP1A1, por lo que ésta fue imposible de analizar; en estos casos, sólo se expresó el gen endógeno.

Materiales

La principal materia prima fueron las muestras de tejido tiroideo humano, que se obtuvieron como producto de tiroidectomía parcial o total de pacientes a los que se les realizó este procedimiento en el Hospital Central Militar de la Ciudad de México y que firmaron su hoja de consentimiento válidamente informado en los periodos comprendidos de enero a noviembre de 2012 y de noviembre de 2013 a octubre de 2014. La expresión de CYP1A1 se obtuvo en colaboración estrecha con el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad (EMGS). Se utilizaron diversos equipos y reactivos concentrados en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la institución.

Método

Captación de pacientes: se vigiló la programación diaria del quirófano durante los periodos establecidos y previo a la cirugía se seleccionaron los pacientes en estudio que serían sometidos a cirugía de tiroides, abordándolos en la víspera de la cirugía; los datos se ingresaron a una base de datos y se prepararon las condiciones para la obtención de las muestras.

Recolección de los datos clínicos: los datos clínicos y patológicos se recolectaron mediante interrogatorio directo de cada paciente previo a la cirugía y mediante la búsqueda en el archivo clínico físico y electrónico del Hospital Central Militar; se elaboraron concentrados de datos en tablas que incluyeron nombre, matrícula, edad, sexo, grupo étnico, residencia, comorbilidades, antecedentes familiares de malignidad, índice de masa corporal, concentraciones séricas de TSH y FT4, etilismo, tabaquismo, consumo de drogas,

exposición a radiación, biopsia por aspiración con aguja fina, cirugía realizada, reporte definitivo de patología, escala TNM y estadio clínico.

Obtención de muestras de tejido: se procedió a coordinar la captación de muestras de tejido de tiroides mediante técnica estéril; de la pieza obtenida se tomó un fragmento compatible al tamaño de la mitad de una alubia, porque la muestra necesaria es de 100 mg; las muestras se guardaron en criotubos de 2.0 mL (Corning Inc., EUA) y se procedió a conservar éstos en el congelador del refrigerador convencional del quirófano 7 del Hospital Central Militar de la Ciudad de México; luego se trasladaron los criotubos en un recipiente térmico lleno de hielo (°0) al Laboratorio Multidisciplinario de Investigación en la EMGS, donde de inmediato se conservaron a una temperatura de -70°C en el ultracongelador Revco® (Legaci ULT2186 3-35 Dupont SVVA Refrigerants), donde permanecieron desde la fecha de obtención y hasta su procesamiento.

Análisis por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa en tiempo real

Técnica de extracción de ARN

Las muestras de tejido tiroideo congeladas se extrajeron del ultracongelador, donde se mantuvieron a una temperatura de -70°C. La cantidad de tejido necesaria para realizar la extracción de ARN es de 100 mg para la técnica de extracción con trizol (Tri Reagent® Solution AMBION), aunque no se requiere toda esa cantidad.

Se tomaron las muestras con técnica estéril, se dividieron y se usó un aproximado de 50 mg que se pesó en una báscula de precisión. Después, las muestras se colocaron en tubos de ensayo (10 x 100 mm) libres de ribonucleasas (lavados previamente con NaOH 0.8 M y esterilizados por calor), se les adicionó 0.1 mL de trizol y se homogenizaron con ayuda de un politrón



(Omni µH International) por cinco minutos, hasta observar la muestra licuada en su totalidad; a continuación la mezcla se colocó en un tubo Eppendorf limpio de 1.5 mL y libre de ribonucleasas y se dejó actuar el reactivo durante cinco minutos a temperatura ambiente. Luego de ese tiempo, se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C; al término de la centrifugación se recolectó el supernadante y se trasladó a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL, libre de ribonucleasas; se agregaron 150 µL de cloroformo grado molecular y se mezcló vigorosamente durante 15 segundos para después dejarla incubando a temperatura ambiente durante 15 min. Al finalizar este tiempo, se pudieron observar dos fases; se centrifugó nuevamente a 12,000 g por 15 min a 4°C; se tomó la fase acuosa superior, se trasladó a otro tubo Eppendorf y se le agregaron 500 µL de alcohol isopropílico; se mezcló en la agitadora voticial por 10 segundos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. Posterior a este paso se pudo observar una pequeña pastilla de aspecto viscoso, se decantó el sobrenadante y se lavó con etanol a 75%; este paso se realizó al centrifugar a 7,500 g durante cinco minutos; se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante cinco minutos. Finalmente se agregaron 80 µL de agua libre de nucleasas y la muestra se guardó a -70°C.

Cuantificación del ARN por espectrofotometría

Para determinar las concentraciones de ARN total se utilizó una técnica mediante espectrofotometría con un nanofotómetro electrónico automatizado (Thermo Scientific, modelo Nanodrop1000, serie 1371); aunado con el programa de éste, se utilizó para esta prueba 1 µL del ARN extraído, cuantificado en µg/µL, considerando siempre en índice de pureza (índice de absorbancias) 260/280, reportado también por el programa; la pureza se considera aceptable por arriba de 2 para ARN.

Verificación de la integridad del ARN en geles de agarosa a 1.5%

Para esto, se procede a la visualización del ARN. Del total extraído de las muestras de tejido tiroideo se tomaron 6 µL y se mezclaron con 1 µL de amortiguador de carga a cada uno; luego se depositó la mezcla de cada una de las muestras en los diferentes pozos del gel de agarosa (Invitrogen™), que previamente se sumergió en el amortiguador TBE (Tris/Borate/EDTA) (J.T. Baker®) para ser corrida; también se cargó el marcador de una kilobase, que fue un indicador del peso del ARN en pares de bases (pb) y se sometió a una carga (de - a +) de 60 V, correspondiente a 20 miliamperes, aproximadamente, durante 20 minutos: posteriormente el gel se expuso a luz UV (EDAS 290 Kodak), con lo que se revelaron las bandas (28S y 18S) de ARN y se les tomaron fotografías con el programa Kodak.

Diseño y validación de iniciadores específicos

El diseño de los iniciadores específicos del gen de los CYP 1A1 (Cuadro 1) se realizó con el programa Oligo Explorer. La secuencia se obtuvo del GenBank™. La búsqueda de la secuencia se hizo en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para confirmar su especificidad. Al usar el programa Oligo Analyzer y PDRAW se corroboraron las características del primer gen; esto fue un paso determinante para estandarizar los parámetros que se utilizaron en la PCR-RT en tiempo real.

PCR en tiempo real (protocolo Rotor-Gene 3000)

Las reacciones de la PCR-RT en tiempo real se realizaron con 16 µL de ARN extraído de los tejidos estudiados previamente, se estandarizó a la misma concentración cada una de las muestras, a 20 ng/µL; las diluciones para la validación del control interno, cuantificación absoluta y la determinación de las eficiencias

Cuadro 1. Secuencias diseñadas para los CYPs (*Homo sapiens*)

CYPs	Secuencias	Ampliación (pb)	ARNm (pb)
1A1	5'-TTCTTCGCTACCTACC-CAAC-3' 5'-CTGCTTCTCCTGACAG-TGC-3'	161	2354

de todos los iniciadores específicos se efectuaron con el equipo SuperScript™ III Platinum® SYBR® One-Step qRT-PCR Kit with ROX (Invitrogen, Carlsbad, CA), que es una mezcla de reacción que contiene un complejo de Taq ADN polimerasa (platinum) con anticuerpo que inhibe la actividad a temperatura ambiente; este anticuerpo es desnaturalizado en la fase inicial del ciclo de la PCR (95°C a los cinco minutos). Los siguientes componentes de la reacción se prepararon a una concentración final: de la mezcla de reacción de 6.25 µL 2X SYBR® Green I (amortiguador contenido en SYBR® Green I dye) 0.4 mM por cada dNTP y 6 mM MgSO4 (ROX Reference Dye), que es un estabilizador del amortiguador (1X), 4 µL ARN total, 0.25 µL SYBR® Green One Step Enzyme Mix (contenida en SuperScript™ III RT Platinum® Taq DNA polymerase) e inhibidor de ribonucleasa (recombinante de ribonucleasa), 0.4 µL MgCl2 (50 mM), 0.4 µL del primer forward (0.4 µM), 0.4 µL del primer reverso (0.4 µM) y 0.8 µL de agua libre de ribonucleasas (12.5 µL de la mezcla reacción final) y llevados a tubos de 100 µL. La reacción se sometió en un inicio a 52°C durante 10 minutos, para la síntesis de ADN, y a 94°C por cinco minutos, para el inicio de la actividad de la Taq polimerasa (platinum Taq) y la predesnaturalización del híbrido ARN-cADN, seguido de los ciclos de amplificación de la PCR con 40 ciclos, consistente cada ciclo de 95°C por 20 segundos (s), 57°C por 20 s y 72°C por 20 s. El paso de la curva de fusión se esperaba que tuviera un intervalo de temperatura de 60-

98°C, con incremento de temperatura de 0.1°C por segundo y finalmente un paso a 40°C. Para la cuantificación absoluta fue necesario determinar el ciclo umbral (Ct) para cada transcrito. La expresión del citocromo estudiado se cuantificó con el modelo estadístico (REST®) para el análisis de las eficiencias y la cuantificación relativa del citocromo estudiado. Para visualizar la amplificación del primer citocromo, el producto de la qRT-PCR se corrió en un gel de agarosa a 2.5%, siguiendo el procedimiento mencionado.

Análisis PCR-RT en tiempo real

Los datos de la cuantificación absoluta del citocromo se realizaron mediante el programa Rotor-Gene 6.0 (Corbett Life Science, Sidney, Australia). Los datos se graficaron con este programa y se exportaron a una tabla de Excel, con regresiones lineales similares para la eficiencia del primer citocromo, donde se comparó la concentración logarítmica contra el Ct, y los datos de las curvas de calibración para los citocromos estudiados y el gen GAPDH se analizaron con el mismo programa. Para la validación se usó el modelo estadístico BestKeeper Gene; la eficiencia correspondiente al primer citocromo se calculó de acuerdo con la ecuación 1, usando REST®. A. Las intensidades de la fluorescencia relativa (Rf) se graficaron contra el número de ciclos de la PCR por cinco diferentes números calculados de patrones moleculares de ARN con intervalo de 0.001 a 10 ng/mL del total de ARN aislado de las muestras por el gen GAPDH.

Al continuar con el protocolo de la PCR-RT en tiempo real, las muestras se sometieron a un protocolo de disociación con temperatura de 60 a 98°C y se indicó el número de productos existentes en cada reacción con el producto esperado (control negativo).



Análisis de datos

Plan de análisis: se conjuntó en un cuadro toda la información clínica relevante obtenida en el interrogatorio de los pacientes y en su archivo clínico posterior a ser intervenidos quirúrgicamente. Los resultados de expresión relativa de citocromo P450 1A1 se conjuntaron en un cuadro y se compararon en ambos grupos.

Análisis estadístico: se aplicaron medidas de tendencia central y de dispersión. Se analizaron las frecuencias y porcentajes de los datos clínicos cualitativos y cuantitativos y se realizaron cuadros de contingencia con el programa estadístico SPSS ver. 19; el análisis específico de la expresión génica relativa se realizó mediante el modelo estadístico específico para expresión génica REST[®] basado en el método Pfaffl,¹⁸ que en este caso está basado en la plataforma de Excel, pero con algoritmos matemáticos avanzados y exclusivos para la expresión génica.

RESULTADOS

Muestreo final

Se consideraron las 26 pruebas corridas en el estudio piloto realizado en 2012 y se corroboraron los datos clínicos de los pacientes al tomar en cuenta los valores de extracción de ARN y su expresión génica relativa en Ct. Se obtuvieron 38 muestras en total de tejido tiroideo del mismo número de pacientes en el periodo de estudio. Al realizar un tamaño de muestra total inicial de 64, éste se dividió en dos grupos respecto a su diagnóstico histopatológico: uno de enfermedad maligna, con 32 muestras, y uno de enfermedad benigna, con igual número de muestras; sin embargo, durante el periodo de experimentación en laboratorio se eliminaron cinco muestras: dos debido a la falta de replicación de ADN durante PCR-RT y tres por falta de expresión específica

del gen problema, por lo que el número de muestra final quedó en 59.

Caracterización de la muestra

De una muestra inicial de 64, 32 pacientes tuvieron enfermedad maligna y 32, enfermedad benigna; se realizaron las asociaciones por grupos de acuerdo con los datos clínicos, separándolas y analizándolas de acuerdo con el sexo, edad, antecedentes crónico-degenerativos, entre otros factores, así como un análisis epidemiológico superficial de las variables no principales del estudio que constituyeron los siguientes datos clínicos y de esta manera caracterizar el comportamiento de nuestra muestra:

Edad: se obtuvo una muestra heterogénea respecto a las edades, con mínima de 23 años y máxima de 82; media de 55 años (Figura 1).

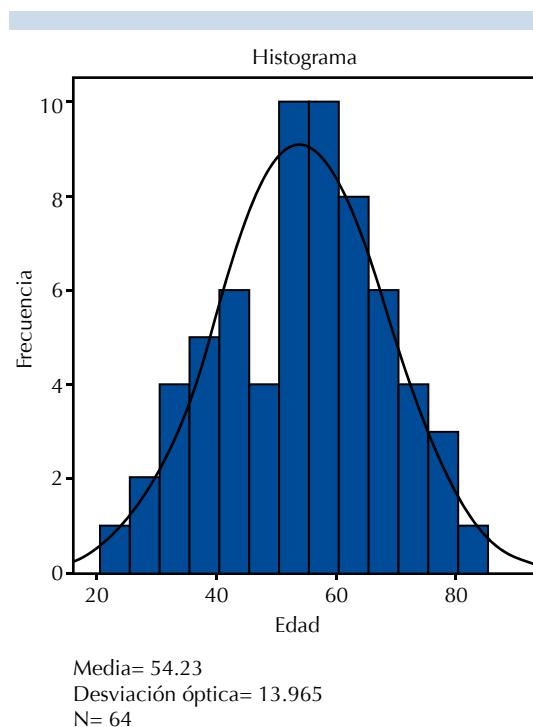


Figura 1. Distribución de los pacientes por edad.

Respecto a los grupos de estudio, las edades fueron muy similares, con media de 54.81 para enfermedad maligna y de 53.66 para enfermedad benigna.

Sexo: se mantuvo el predominio femenino, con 80% por ciento de los casos contra 20% de hombres, en una relación mujer:hombre de 3.9:1.

Respecto a enfermedad benigna y maligna, en este rubro hubo una ligera variación respecto a la tabla general; en la enfermedad benigna, sólo 6% eran hombres, mientras que en la enfermedad maligna 34% eran de sexo masculino.

Grupo étnico: todos los pacientes se consideraron mestizos porque sus características raciales no diferían de la generalidad de la población mexicana; por tanto, no hubo ninguna variación atribuida a algún grupo étnico en particular.

Zona endémica de bocio: esta variable es de importancia relativa porque persisten zonas endémicas de bocio en nuestro país, en las que esta afección tiroidea es un problema de salud pública; al respecto se encontró que 78% de la población no procedía de las áreas endémicas, por lo que la enfermedad tiroidea en áreas no endémicas parece ser más relevante, la mayoría de los pacientes procedían del Estado de México y del Distrito Federal.

Índice de masa corporal: algunos estudios relacionan de manera directa diversos tipos de cáncer con la obesidad, por lo que esta variable es relevante para nuestro estudio. En la muestra general encontramos que la mayoría de la población estudiada tenía sobrepeso u obesidad (Cuadro 2).

Antecedentes familiares: se han descrito diversas asociaciones familiares, inclusive cáncer medular de tiroides de tipo familiar, por lo que esta variable es relevante siempre que se hable de enfermedad tumoral; en nuestro grupo de estudio no se encontró ningún caso de cáncer

Cuadro 2. Frecuencia de sobrepeso, obesidad y peso normal, de acuerdo con el índice de masa corporal

Índice de masa corporal	Frecuencia (n)
Normal	24
Sobrepeso	24
Obesidad	16
Total	64

familiar y un porcentaje menor de pacientes (19%) tenía antecedentes familiares de cáncer de cualquier tipo.

Antecedentes patológicos: los antecedentes de enfermedades siempre son relevantes en un estudio clínico, ya sea para fines de tratamiento o de investigación; por ello se interrogó a cada paciente y se encontró que 44 no tenía ningún antecedente, mientras que el resto sí; las enfermedades más prevalentes fueron diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial sistémica con comorbilidades diversas.

Adicciones: respecto a esta variable, que comprende tabaquismo, etilismo y consumo de drogas, se obtuvieron resultados variables y no parece existir una asociación clara con la enfermedad de tiroides (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia de adicciones en la muestra general

	Frecuencia (n)
Tabaquismo	
Negativo	53
Positivo	11
Total	64
Etilismo	
No	58
Ocasional	2
Sí	1
Social	3
Total	64
Consumo de drogas	
No	62
Sí	2
Total	64



El tabaco está asociado con diversos tipos de cáncer; en comparación con el grupo de enfermedad benigna, hubo mayor prevalencia de fumadores en el grupo de enfermedad maligna, de 9 contra 25%, respectivamente.

Exposición a radiación: es un factor comprobado que aumenta la incidencia de cáncer de tiroides; en este estudio sólo hubo un caso, de una paciente ex trabajadora del área de la salud con exposición comprobada a radiación durante años.

Perfil tiroideo: la determinación de hormonas tiroideas es el primer estudio indicado luego de detectar la existencia de un nódulo tiroideo; en nuestro servicio, por protocolo, se realiza en todos los pacientes. Generalmente, la enfermedad quirúrgica de tiroides no tiene alteraciones tan notorias en este perfil; en el grupo de estudio se observó que pocos pacientes tenían concentraciones fuera de la normalidad (Figura 2).

Estudio histopatológicos y citológicos: los reportes citológicos de la biopsia por aspiración con aguja fina son la primera guía para decidir la intervención terapéutica; el reporte definitivo de patología permite normar la conducta a seguir con el paciente, luego de la cirugía. En este estudio se tomó biopsia por aspiración con aguja fina en la mayoría de los pacientes, previo a su cirugía; los diagnósticos reportados se muestran en el Cuadro 4.

El reporte histopatológico definitivo marca el criterio a seguir en el tratamiento de cada paciente y el pronóstico de éste. Nuestro estudio permitió, además, clasificar a los pacientes en los grupos de enfermedad benigna y maligna; se analizó la frecuencia de los diagnósticos, mismos que aparecen por grupos en los Cuadros 5 y 6.

Clasificación TNM y estadio clínico: los pacientes con enfermedad maligna se ordenaron respecto a su clasificación oncológica, lo que mostró este

comportamiento: el más prevalente al momento de la cirugía fue el T4aN1bM0 y el estadio clínico más frecuente fue IVa, debido probablemente a que se trataba de una afección silente a lo largo del tiempo y se detectó en etapas avanzadas (Figuras 3 y 4).

Tipo de cirugía realizada: aunque este dato no tiene relevancia significativa en el estudio, nos indicó la actividad quirúrgica realizada en el servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y Cuello del Hospital Central Militar de México (Figura 5).

Extracción de ARN

Se procedió a la extracción del ARN del tejido de las 38 muestras obtenidas en este periodo de estudio. La extracción se realizó mediante la técnica de Trizol; al finalizar el proceso se cuantificó el ARN por espectrofotometría con ayuda del Nanodrop 1000 y luego se verificó la integridad del ARN de las muestras mediante la utilización de gel de agarosa, con su posterior visualización con luz ultravioleta (Figura 6).

Una vez verificada la integridad del ARN de las muestras, se cuantificó el ARN mediante nano-espectrofotometría, verificando el índice de pureza; los resultados obtenidos se comunican en el Cuadro 7.

Debido a la gran variación en cuanto a la cuantificación de ARN total entre cada una de las muestras, éstas se llevaron, mediante diluciones, a una concentración igual, que se estableció en 20 ng/ μ L, ideal para realizar la PCR-RT.

Expresión relativa de CYP1A1 en enfermedad maligna mediante PCR-RT

Se realizó PCR-RT, de donde se obtuvieron los valores de Ct para todas las muestras que tuvieron una amplificación adecuada y expresión

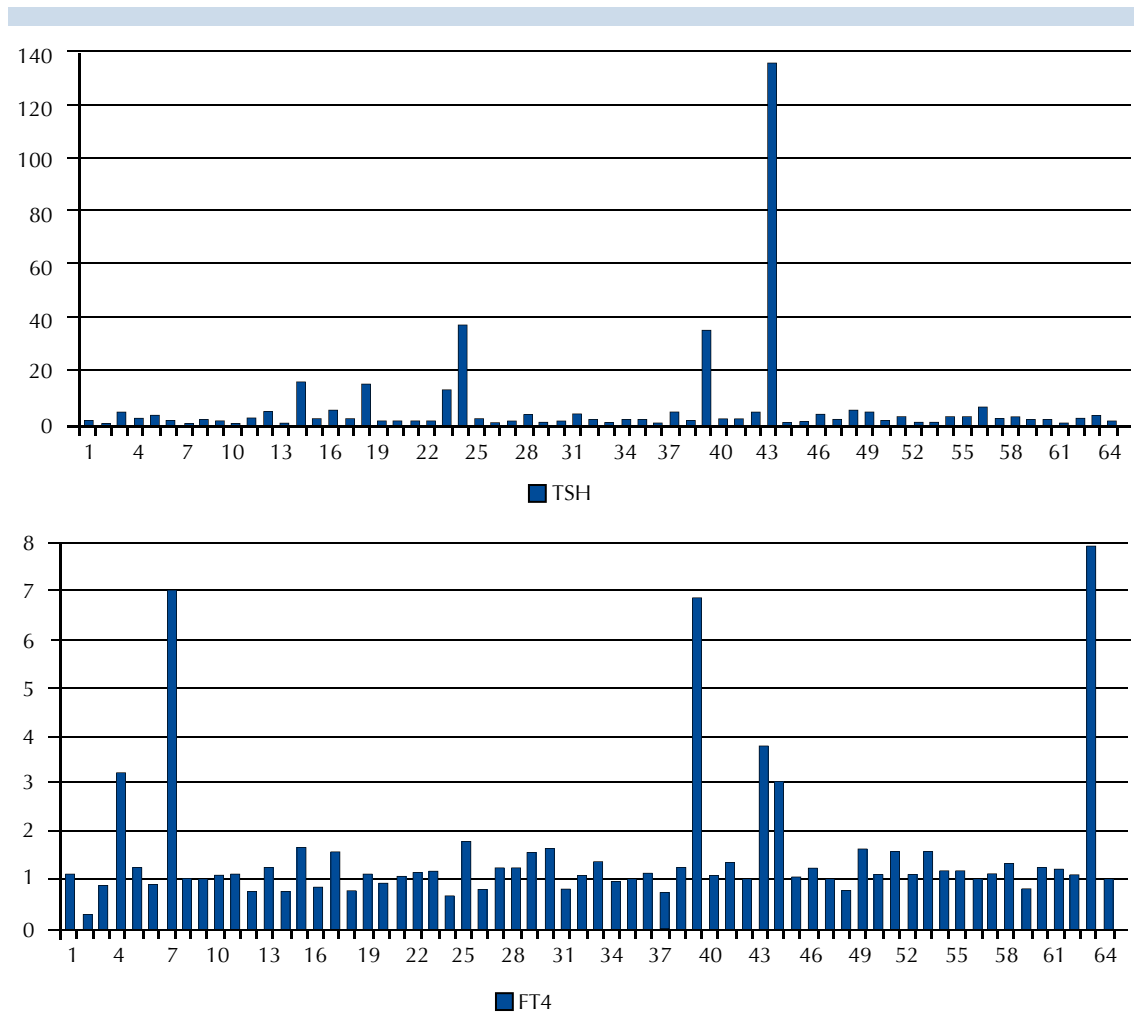


Figura 2. Concentraciones representativas de hormonas tiroideas en cada muestra.

génica del CYP1A1 respecto al gen endógeno GAPDH; esto se realizó por duplicado en las primeras 44 muestras y por triplicado en las últimas 20; en este proceso se eliminaron cinco muestras, por lo que se finalizó con un total de 59 muestras; de éstas, 30 correspondieron a enfermedad maligna y 29 a enfermedad benigna. Durante el procedimiento se evaluaron las curvas de replicación y curvas Melt; estas últimas representan el punto de desnaturalización de las proteínas contenidas en cada muestra (Figuras 7 y 8).

Las concentraciones promedio de Ct (cuantificación relativa) se representan en el Cuadro 8.

Los valores de Ct de cada una de las muestras se normalizaron al restar el valor del Ct del gen endógeno GAPDH; de esta manera se obtuvieron gráficas de la expresión normalizada para el grupo de enfermedad maligna y para el grupo control (Figuras 9 a 11).

Con los valores de Ct se procedió a realizar el análisis final mediante el modelo matemático



Cuadro 4. Diagnóstico por biopsia por aspiración con aguja fina

BAAF	Frecuencia
Atipias	3
Bocio	21
C. folicular	3
Carcinoma papilar de células T	18
Hiperplasia	4
Insufici	1
Les fol	1
Mets. Ca	1
Neo fol	2
No concluyente	4
No realizado	2
Poco diferenciado	1
Quiste	2
Tiroiditis	1
Total	64

Cuadro 5. Frecuencia de diagnósticos definitivos de enfermedad maligna

Malignidad	Frecuencia (n)
Carcinoma diferenciado	1
Carcinoma pap, c/desdiferen	1
Carcinoma medular	3
Carcinoma papilar	24
Linfoma no Hodgkin	1
Microcarcinoma papilar	2
Total	32

Cuadro 6. Frecuencia de diagnósticos definitivos de enfermedad benigna

Benignidad	Frecuencia (n)
Adenoma de cel. hur	3
Adenoma folicular	4
Bocio multinodular	11
Bocio nodular	4
Hiperplasia adenomatosa	2
Nódulo adenomatoide	3
Nódulo adenomatoso	2
Tiroiditis granuloma	1
Tiroiditis linfocítica	1
Tumor folicular	1
Total	32

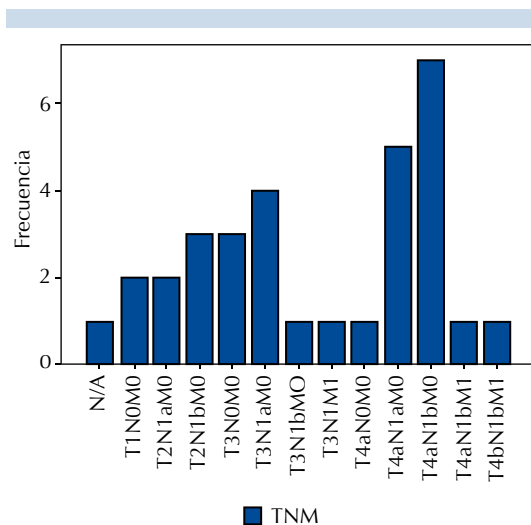


Figura 3. Clasificación TNM de enfermedad maligna; en este caso, el más prevalente resultó T4aN1bM0.

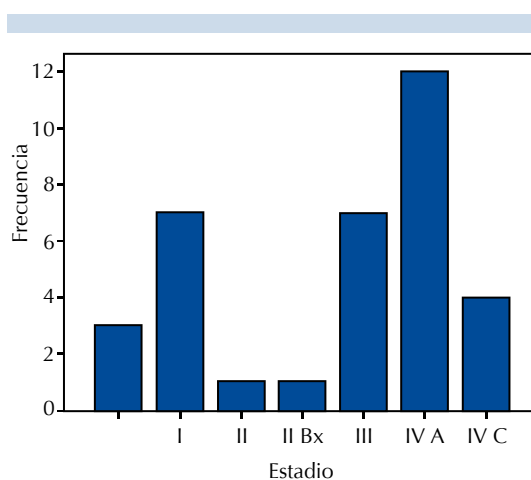


Figura 4. Estadios clínicos encontrados en el grupo de enfermedad maligna.

de expresión relativa del protocolo REST[®], que a su vez está basado en la publicación original de Pfaffl, lo que permitió obtener los resultados finales de expresión relativa del CYP 1A1 normalizado con el gen endógeno y, a su vez, comparado entre ambos grupos de estudio, lo que

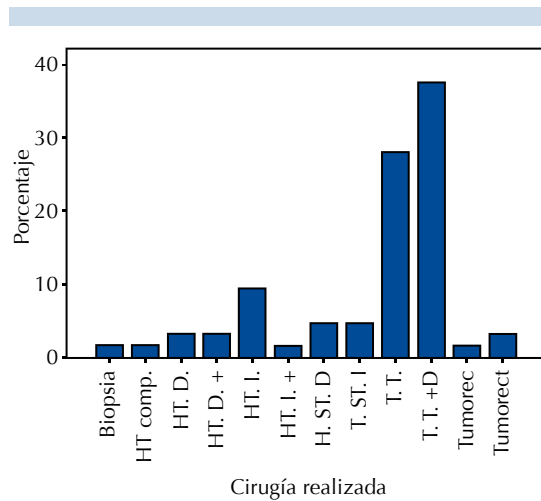


Figura 5. Frecuencia de cirugías realizadas durante el estudio.

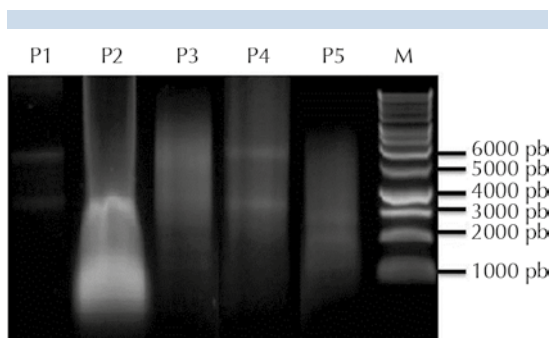


Figura 6. Integridad del ARN corrido sobre un gel de agarosa con muestras de cinco pacientes y el marcador preestablecido. Se aprecian dos bandas en cada paciente, que es característica de las unidades del ARN 28s y 18s.

finalmente reportó una sobreexpresión del CYP 1A1 en enfermedad tumoral maligna de tiroides sobre la enfermedad benigna con un factor de 1.968; a pesar de que por este método estadístico se obtuvo $p=0.3048$, que resultó no ser estadísticamente significativa, se corroboró una tendencia a la sobreexpresión del CYP1A1 en el grupo de enfermedad maligna. De esta manera finalizó el análisis de expresión (Figura 12).

Cuadro 7. Cuantificación de ARN total por cada muestra de tejido

Enfermedad maligna		Enfermedad benigna	
Muestra	ng/μL	Muestra	ng/μL
1	656.98	1	614.35
2	610.47	2	640.03
3	616.28	3	10.18
4	378.88	4	687.51
5	4.85	5	601.75
6	490.80	6	560.08
7	661.35	7	684.11
8	240.31	8	703.50
9	733.05	9	610.47
10	52.33	10	129.85
11	35.36	11	688.96
12	1777.7	12	86.24
13	1799.5	13	629.37
14	2921.6	14	696.71
15	2357.6	15	454.46
16	2518.7	16	743.4
17	2498.1	17	2124.0
18	2157.7	18	2397.8
19	2427.3	19	2327.0
20	2193.7	20	118.6
21	102.7	21	2271.5
22	69.95	22	2767.1
23	428.74	23	2220.2
24	435.79	24	396.62
25	100.87	25	1606.27
26	931.97	26	564.08
27	756.14	27	1095.87
28	702.91	28	50.98
29	640.19	29	325.58
30	273.42	30	144.50
31	607.98	31	543.74
32	1557.17	32	372.52
Promedio	991.8871875	Promedio	870.8540625
Promedio=	931.370625	DE (±)	= 843.3160353

La concentración de ARN se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 versión 3.7 (Thermo scientific, Del., EUA). Este cuadro comunica la concentración en nanogramos por microlitro de ARN presente en cada muestra. Se muestra el promedio por grupos, promedio general, t de Student y desviación estándar general.

DISCUSIÓN

La enfermedad tumoral de tiroides es la principal causa de cirugía de cuello en el servicio

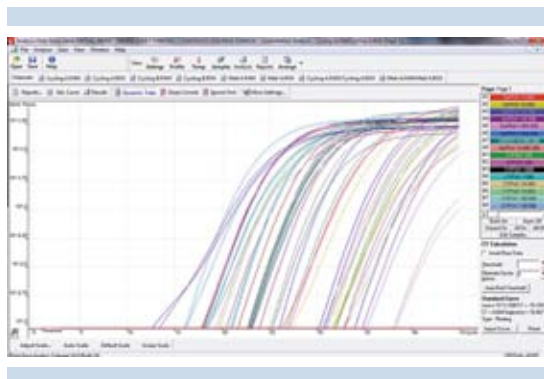


Figura 7. Ejemplo de curvas de replicación de PCR en el programa del Roto-gene 300, con la línea threshold en la intersección de la fase logarítmica de cada una de las muestras que corresponde al Ct.



Figura 8. Ejemplo de curvas Melt, donde se aprecia la diferencia entre puntos de desnaturalización por calor de los diferentes componentes; en este caso, CYP1A1 en el pico menor y GAPDH en el más alto.

de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar de México, DF; por ello, cualquier estudio que se realice en esta área es de suma relevancia para ampliar nuestro conocimiento acerca de este padecimiento. Aunque las causas de que una persona sana resulte con cáncer de tiroides, o bien, que una enfermedad benigna se malignice aún no están bien establecidas, existen abundantes publicaciones al respecto, con estudios epidemiológicos, clínicos, toxicológicos, moleculares, genéticos, etcétera, porque en todo el mundo se

Cuadro 8. Expresión génica relativa (Ct) obtenida de cada una de las muestras y por grupos; al final se indica el promedio

Muestra de enfermedad maligna	Ct	Muestra de enfermedad benigna	Ct
1	32.34	1	29.85
2	32.63	2	30.53
3	32.33	3	32.68
4	26.76	4	28.54
5	31.56	5	28.16
6	30.81	6	32.34
7	36.11	7	34.12
8	33.78	8	31.83
9	35.17	9	32.93
10	28.63	10	31.99
11	39.04	11	41.93
12	33.06	12	37.36
13	33.36	13	36.03
14	28.30	14	33.57
15	33.81	15	32.71
16	37.07	16	31.06
17	33.40	17	31.49
18	27.67	18	27.19
19	30.25	19	31.17
20	29.53	20	33.02
21	25.26	21	25.63
22	22.22	22	30.29
23	26.89	23	23.47
24	21.90	24	23.30
25	17.37	25	26.06
26	16.99	26	17.68
27	16.80	27	20.58
28	17.15	28	17.39
29	18.40	29	15.72
30	16.32	Promedio	29.26275862
Promedio	28.16283333		

intenta conocer mucho más acerca el cáncer, con el fin de poder atacarlo desde sus bases. El estudio genético y molecular de una afección se ha convertido en un área obligada si se desean conocer las respuestas a todos los cuestionamientos al respecto.

Nuestro estudio es una compilación de dos trabajos: el primero es un estudio piloto realizado en México acerca de la asociación entre

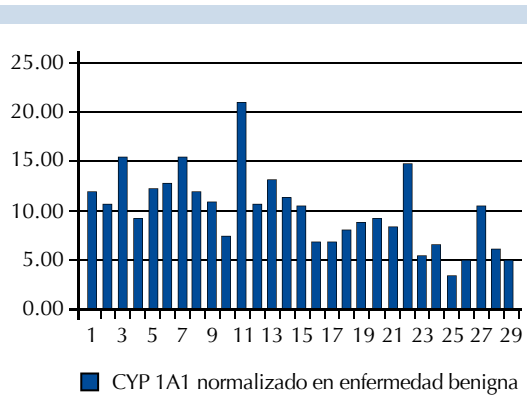


Figura 9. Expresión relativa de CYP 1A1 ya normalizado con el GEN endógeno GAPDH en el grupo de enfermedad benigna.

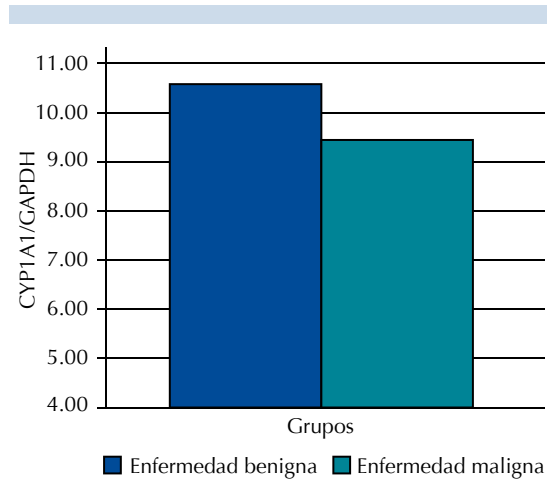


Figura 11. Representación del promedio de Ct entre ambos grupos de estudio. Se muestra una mínima diferencia entre ellos.

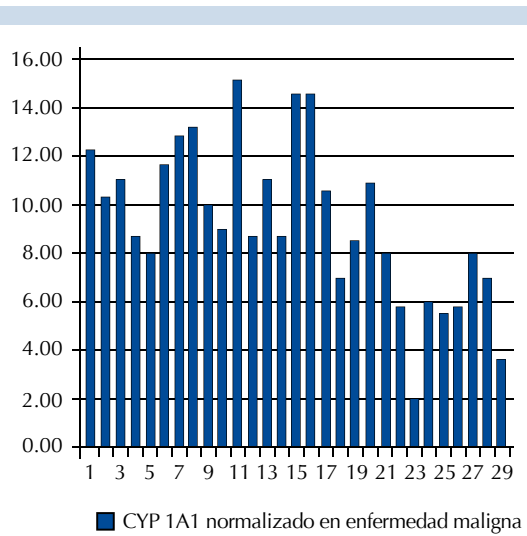


Figura 10. Expresión relativa de CYP 1A1 ya normalizado con el gen endógeno GAPDH en el grupo de enfermedad maligna.

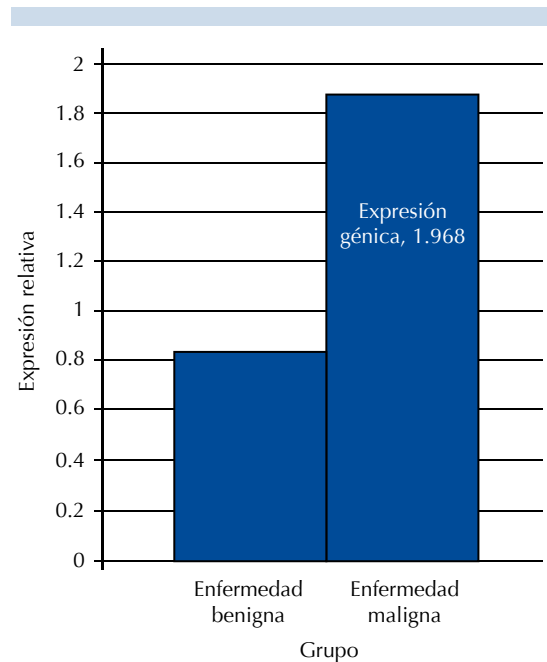


Figura 12. Representación final de la expresión relativa de CYP 1A1, que muestra la sobreexpresión de éste en el grupo de enfermedad maligna respecto al grupo de enfermedad benigna.

cáncer de tiroides y citocromos; éste se realizó en nuestro servicio.

Al tener una ampliación de criterios, información y número de muestras por nuestro grupo de



trabajo, las conclusiones del estudio piloto arrojaron una posible sobreexpresión de CYP1A1 en enfermedad tumoral benigna, más que en la enfermedad tumoral maligna. En nuestro análisis, considerando los resultados que llevaron al anterior argumento, llegamos a una conclusión totalmente diferente, porque la sobreexpresión se corroboró en la enfermedad tumoral maligna; sin embargo, no existe diferencia significativa entre estos grupos, por lo que el peso de nuestras conclusiones no es el que se esperaba para considerarlo un punto pivote o un blanco para futuros tratamientos mediante bloqueo genético; más aún: el tamaño de nuestra muestra es limitado para obtener conclusiones de peso y, en algún momento, también poder afirmar que la evidencia no muestra diferencia entre los grupos. Probablemente, un punto de mayor relevancia sería contar con un grupo de pacientes sanos para establecer una expresión basal de CYP 1A1, así como una expresión relativa para enfermedad benigna y maligna; esto último no parece tener un panorama ético adecuado, pues no se podrían obtener las muestras necesarias para realizar un estudio de estas características. En realidad existe poca investigación en el mundo respecto a la asociación directa del CYP 1A1 y enfermedad tiroidea; hay más investigación respecto a otros diversos tipos de cáncer y su asociación con citocromos, específicamente con CYP 1A1, pero ésta no ha sido concluyente, lo que sugiere la necesidad de mayor investigación al respecto.

En un metanálisis realizado en China, Wu, Liu y Huang sugieren que CYP1A1, en sus polimorfismos MspI y Ile462Val, contribuye a incrementar la susceptibilidad a cáncer en general en población asiática; en nuestro estudio no podríamos llegar a una conclusión tan determinante, porque nuestro resultado no es estadísticamente significativo y la sobreexpresión respecto al gen endógeno es apenas ligeramente superior en la enfermedad maligna. En el estudio de He y colaboradores,

de 2013, se comenta que respecto a leucemia, cáncer de vejiga y cáncer de tiroides existen resultados heterogéneos, por lo que no se puede concluir una asociación del polimorfismo CYP1A1 T3801C en la evolución de este tipo de tumores, aunque sí en otros, como cáncer de pulmón, hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello. Nuestro estudio no puede concluir con una asociación entre CYP 1A1 y cáncer, al igual que el estudio de He y colaboradores, por lo que se requiere más investigación al respecto.

En Rusia, Kochetova y su grupo, en un estudio publicado en junio de 2014, encontraron asociación de CYP 1A1 con el riesgo de tener bocio, sin comentar riesgo de enfermedad maligna; esto podría trasladarse a nuestro estudio, porque encontramos que existe sobreexpresión de este gen en enfermedad maligna y benigna, y la diferencia entre éstas no fue significativa; de hecho, las conclusiones del estudio piloto de 2012 en nuestro servicio también están en este tenor. Otro artículo ruso de 2012, de Irmiakova y colaboradores, sustenta esa misma asociación de expresión de CYP 1A1 en trabajadoras de una industria petroquímica y el riesgo de padecer enfermedad tiroidea en general, con riesgo específico de bocio.

No existe evidencia de primer nivel para asociar el CYP 1A1 con enfermedad maligna de tiroides. En un estudio titulado CYP1A1: Friend or foe? (CYP 1A1: ¿amigo o enemigo?) de 1993, Beresford comentó que los citocromos son compuestos moleculares con mala fama en la prensa médica, que están asociados con diversos tipos de tumores malignos, pero que la evidencia no es tan fuerte; incluso, también se les encontraron mecanismos de protección. En las conclusiones del estudio piloto se comentó específicamente que no se observó sobreexpresión en la enfermedad maligna, aún más ligera en la enfermedad benigna, lo que puede representar un mecanismo de protección contra el cáncer.

Incluso se realizaron reportes en Arabia Saudita, en 2008, donde Abdul y Mona concluyen que la existencia de CYP 1A1 y otros genes podrían estar implicados de manera importante en la evolución de la enfermedad tiroidea, en específico en cáncer papilar de tiroides, lo que podría concordar con los resultados finales de nuestro estudio.

En Brasil, Reiss y su grupo, en 2010, realizaron un estudio específico acerca de la asociación de CYP 1A1 y la existencia o no de nódulos tiroideos, en el que no se reportó asociación significativa entre la existencia de éstos con citocromos; esto aún no lo podemos concluir con nuestros resultados porque no tenemos la expresión únicamente del gen en presencia de un nódulo tiroideo.

En nuestro estudio buscamos la expresión del CYP1A1 en tejido tiroideo en enfermedad benigna y maligna; en ambas existe sobreexpresión, sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, por lo que podemos inferir que el CYP 1A1 está sobreexpresado en cualquier padecimiento tiroideo. Con los resultados de nuestro estudio no podemos afirmar una asociación directa; sin embargo, sí podemos declarar que al menos en números totales sí se observó sobreexpresión relativa en el grupo de enfermedad maligna contra el grupo de enfermedad benigna. Por ello se requieren estudios más amplios en tiempo y en recursos, incluso multicéntricos, para obtener conclusiones más firmes al respecto.

Aprovecho este espacio para describir una nueva manera de hacer medicina, aprendida durante el desarrollo de este proyecto de investigación. Se trata del concepto "medicina traslacional", que implica llevar una pregunta clínica del consultorio al laboratorio y traer la respuesta de regreso, con lo que se espera derribar la frontera entre ciencia básica y medicina aplicada.

Nuestro proyecto de investigación se involucró en todo momento en estos conceptos; y en este marco, el clínico se convierte en investigador básico, pues se encarga de generar datos y obtener muestras, trasladarlas y procesarlas; y en conjunto con el personal especializado, se obtienen respuestas, que enriquecerán en el futuro la práctica clínica diaria y romperán la barrera donde la ciencia básica sólo investiga en ratas y los clínicos únicamente lo hacen en hospitales y no en laboratorios especializados de biología molecular o genómica.

En nuestra institución tenemos la fortuna de contar con recursos suficientes para desarrollar amplios protocolos de medicina traslacional, donde el residente de especialidad pueda traspasar las barreras del hospital, sin dejar de ser un excelente clínico, y vaya más allá, en busca de respuestas a las preguntas que se generan en el consultorio y en el quirófano. De esta manera fortalecerá sus conocimientos y desarrollará habilidades como investigador, contribuyendo de manera real a la evolución científica de su especialidad.

CONCLUSIONES

Desde la concepción de este estudio hipotetizamos acerca de la sobreexpresión de nuestro gen problema en la enfermedad de tiroides, lo que comprobamos. De esta manera, la expresión génica del CYP1A1 en tejido tiroideo patológico está aumentada al menos respecto al gen endógeno de referencia GAPDH. La sobreexpresión del gen se observa en la enfermedad maligna y en la benigna; a pesar de que no existe una diferencia estadísticamente significativa, al concluir este estudio se determinó que la hipótesis se comprobó, por lo que existe sobreexpresión relativa de CYP 1A1 en la enfermedad maligna respecto a la benigna, con factor final de 1.968.



Se requiere mayor investigación respecto a la genómica de la enfermedad de cabeza y cuello, específicamente a enfermedad quirúrgica de tiroides, ya sea maligna o benigna; en este caso, estudios más amplios podrían llevarnos a una conclusión más firme.

REFERENCIAS

1. American Thyroid Association (ATA) Guidelines taskforce on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1167-1214.
2. Hurtado-López L, Basurto-Kuba E, Montes de Oca-Durán ER y col. Prevalencia de nódulo tiroideo en el valle de México. *Cir Cir* 2011;79:114-117.
3. Gharib H, Papini E, Paschke R. Thyroid nodules: a review of current guidelines, practices, and prospects. *Eur J Endocrinol* 2008;159:493-505.
4. Rivera MC, López-Chavira A y col. Manejo quirúrgico de los tumores tiroideos en el Hospital Central Militar. *Rev Sanid Milit Mex* 2007;61: 91-96.
5. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501-511.
6. Donato, MT. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2004;32-43.
7. Bandrés M, Arribas A. Aspectos Fundamentales del Citocromo. Colección Docencia Universitaria, serie Ciencias Biomédicas. Madrid: 2011.
8. Dees EC, Watkins PB. Role of cytochrome P450 phenotyping in cancer treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:1053-1055.
9. Khlifi R, Messaoud O, Rebai A, et al. Polymorphisms in the human cytochrome P450 and arylamine N-acetyltransferase: susceptibility to head and neck cancers. *Biomed Res Int* 2013;2013:582768.
10. Database By National Human Genome Research Institute (NHGRI) http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:2595 HUGO Gene Nomenclature.
11. Shukla RK, Tilak AR, C Kumar C, et al. Associations of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with lung cancer susceptibility in a Northern Indian Population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:3345-3349.
12. Beresford AP. CYP1A1: friend or foe? *Drug Metab Rev* 1993;25:503-517.
13. Reis AA, Silva DM, Curado MP, da Cruz AD. Involvement of CYP1A1, GST, 72TP53 polymorphisms in the pathogenesis of thyroid nodules. *Genet Mol Res.* 2010;9:2222-2229.
14. Kochetova OV, Gaynullina MK, Viktorova TV. DIO2, TPO, CYP1A1 and CYP1A2 gene polymorphism in women with thyroid disease. *Gig Sanit* 2014;3:52-56.
15. Irmiakova AR, Kochetova OV, Gañullina MK, et al. Association of polymorph variants of CYP1A2 and CYP1A1 genes with reproductive and thyroid diseases in female workers of petrochemical industry. *Med Tr Prom Ekol* 2012;5:41-48.
16. Siraj AK, Ibrahim M, Al-Rasheed M, et al. Polymorphisms of selected xenobiotic genes contribute to the development of papillary thyroid cancer susceptibility in Middle Eastern population. *BMC Med Genet* 2008;9:61.
17. Guilhen AC1, Bufalo NE, Morari EC et al. Role of the N-acetyltransferase 2 detoxification system in thyroid cancer susceptibility. *Clin Cancer Res* 2009;15:406-412.
18. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:45.