EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES Y AMPLIFICACIÓN DE ONCOGENES, COMO MARCADORES MOLECULARES EN DNA LIBRE EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR, ATENDIDOS EN CUATRO HOSPITALES DE BOGOTÁ – COLOMBIA.

ALBA MAYERLY ÁLVAREZ MOGOLLÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ
2011

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES Y AMPLIFICACIÓN DE ONCOGENES, COMO MARCADORES MOLECULARES EN DNA LIBRE EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR, ATENDIDOS EN CUATRO HOSPITALES DE BOGOTÁ – COLOMBIA.

ALBA MAYERLY ÁLVAREZ MOGOLLÓN
Código: 598187

Tesis presentada como requisito para optar el título de:

Magíster en Genética Humana

DIRECTOR:
PhD. FABIO ANCIZAR ARISTIZÁBAL GUTIERREZ

COODIRECTORA:
PhD. SANDRA JANNETH PERDOMO LARA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
Bogotá, D. C.
2011

TITULO EN ESPAÑOL: Evaluación del estado de metilación de genes supresores tumorales y amplificación de oncogenes, como marcadores moleculares en DNA libre en plasma de pacientes con cáncer pulmonar, atendidos en cuatro hospitales de Bogotá –Colombia.

TÍTULO EN INGLÉS:Evaluation of methylation status of tumor suppressor genes and amplification of oncogenes, as molecular markers in free DNA in plasma of patients with lung cancer, treated in four hospitals in Bogotá – Colombia.

RESUMEN

Existen diversos factores genéticos y epigenéticos que tienen lugar en la carcinogénesis general y en la pulmonar, entre ellos se ha descrito la amplificación de oncogenes y la metilación de genes supresores tumorales.

En el presente estudio se evaluó la amplificación de los oncogenes MYCL1, MYCN, MYC, EGFR, ERBB2 Y AKT2, y la metilación de los genes supresores tumorales p16, FHIT, APC, TIMP2, MGMT, RASSF1 en DNA obtenido a partir de tejido pulmonar tumoral y plasma sanguíneo de pacientes con cáncer primario de pulmón, y en tejido pulmonar normal y plasma de personas sanas, para determinar si el estado de amplificación y metilación de dichos genesdiferencia entre los fenotipos neoplásico y normal, evaluando también la utilidad del DNA libre en plasma sanguíneo para la detección de las características moleculares del tumor.

Los 6 marcadores de metilación evaluados tienen valores de sensibilidad por debajo de 43, lo que indica que estos marcadores no son eficientes para identificar si un DNA es de un paciente con cáncer o sano. Sin embargo, tener metilado el gen RASSF1 genera un OR de 33, es decir, que si RASSF1A se detecta metilado en el tejido pulmonar, hay 33 veces más probabilidad que este tejido sea tumoral frente a un tejido que no tenga metilado este gen. Si el análisis se realiza a partir de plasma sanguíneo el OR disminuye a 9.

De los 6 genes evaluados para amplificación, el oncogén AKT2 es el que se encuentra amplificado con mayor frecuencia en tumores (74% de las muestras), así mismo es el que mejor discrimina entre fenotipo neoplásico y sano. Este marcador tiene una probabilidad entre 76% y 89% de clasificar correctamente individuos con cáncer e individuos sanos.

Esta investigación muestra la importancia de profundizar en el estudio de marcadores moleculares (oncogénicos y no oncogénicos) en plasma sanguíneo, pudiendo convertirse este tipo de pruebas en el principal método de tamizaje para el abordaje efectivo de la patología neoplásica pulmonar en sus primeras etapas.

Palabras claves: Cáncer de pulmón, Amplificación génica, metilación de promotores génicos, marcadores moleculares, Plasma.

ABSTRACT

There are several genetic and epigenetic factors that occur both in general and lung carcinogenesis, among these described include amplification of oncogenes and tumor suppressor gene methylation.

In this study, an evaluation of the amplification of oncogenes MYCL1, MYCN, MYC, EGFR, ErbB2 and AKT2, and the methylation of tumor suppressor genes p16, FHIT, APC, TIMP2, MGMT, RASSF1A in DNA obtained from lung tissue tumor and blood plasma of patients with primary lung cancer, and normal lung tissue and blood plasma of healthy individuals was performed to determine whether the amplification and methylation status of these genes differs between normal and neoplastic phenotypes, additionally evaluating the usefulness of free DNA in blood plasma for the detection of molecular tumor characteristics.

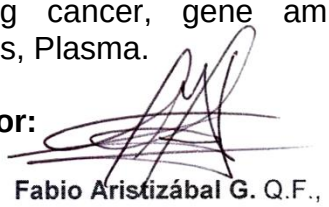
The 6 markers of methylation evaluated have sensitivity values below 43, indicating that these markers are not efficient in identifying if DNA is from a cancer patient or a healthy patient. However, having a methylated RASSF1A gene generates an OR of 33, that is to say, if methylated RASSF1A is detected in lung tissue, it is 33 times more likely that this tissue is tumor tissue compared to tissue that does not have this methylated gene. If the analysis is done with blood plasma the OR reduces to 9.

Of the 6 genes evaluated for amplification, the oncogene AKT2 is found to be amplified more frequently in tumors (74% of samples), so it is the best one to discriminate between a neoplastic and healthy phenotype. This marker has a probability between 76% and 89% to correctly classify individuals with cancer and those that are healthy.

This research shows the importance of further study of molecular markers (oncogenic and non-oncogenic) in blood plasma, with this type of testing potentially becoming the primary screening method for an effective approach to neoplastic lung disease in its early stages.

Keywords: Lung cancer, gene amplification, gene promoter methylation, molecular markers, Plasma.

Firma del Director:



Fabio Aristizábal G. Q.F., Ph.D.

ALBA MAYERLY ALVAREZ MOGOLLÓN
1985

Nota de Aceptación

_____
_____
_____
_____
_____
_____

_____
Firma del Jurado

_____
Firma del Jurado

Bogotá, (18, Mayo, 2011)

Dedicatoria:

A Dios, dador de la vida, la sabiduría, el entendimiento, la ciencia.
A mi madre, por procurar siempre mi bienestar y porque sin su apoyo no hubiese sido posible realizar mis estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

Empiezo por agradecer a todas las personasquedieron su consentimiento informado para participar en esta investigación.

Al Dr. Fabio Aristizabal, por su dirección, colaboración y pacienciaen cada etapa de este proceso.

A todos los compañeros de la maestría, del grupo de Investigación en Farmacogenéticadel Cáncer y del laboratorio de Biotecnología, por su apoyo, ánimo, solidaridad y sobretodo Amistad. Especialmente a Sandra Perdomo, codirectora de este proyecto, quien siempre supo escucharme y aconsejarme, quien me mostró un camino de aprendizaje y esfuerzo del que no me quiero desviar.

Al personal Administrativo del Instituto de Genética, En especial a Islena por su disposición a colaborar ante cualquier solicitud.

Agradezco profundamente la participación del hospital Santa Clara, Fundación Santafé de Bogotá, Hospital Militar y Saludcoop. A las patólogas Paulina Ojeda y Diana Palacios quienes aportaron su conocimiento, experiencia, y disposición, necesarias para la revisión y selección de los casos.

A todos mis maestros que contribuyeron consu conocimiento y ejemplo en mi formación como Genetista.

Agradezco el apoyo económico recibido de la División de Investigación de la sede Bogotá de Universidad Nacional de Colombia, al grupo de Farmacogenética del cáncer y la Fundación Banco de la República.

Y mil Gracias a mi familia, novio y amigos por su cariño, colaboración, y por siempre darme una palabra de ánimo y ejemplo de lucha.

CONTENIDO

pág.

RESUMEN
INTRODUCCIÓN
1. MARCO TEÓRICO ……. 16
1.1 LOS PULMONES …….. 16
1.1.1 ANATOMÍA Y FUNCIÓN PULMONAR ……..... 16
1.1.2 EL EPITELIO RESPIRATORIO ……..... 18
1.2 CÁNCER DE PULMON ……..... 18
1.2.1 LESIONES PRE-NEOPLÁSICAS ……..... 18
1.2.2 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA ……..... 19
1.2.3 FACTORES DE RIESGO ……..... 20
1.2.4 HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN 21
1.2.5 DETECCIÓN DE CÁNCER DE PULMÓN EN PLASMA ……. 22
1.2.6 ORIGEN MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN ……... 22
1.2.6.1 Metilación Aberrante en Regiones Promotoras de Genes Supresores Tumorales. ……... 23
1.2.6.2 Genes metilados frecuentemente en cáncer de pulmón incluidos en este estudio. ……. 25
1.2.6.3 Amplificación Oncogénica ……... 28
1.2.6.4 Genes amplificados frecuentemente en cáncer de pulmón incluidos en este estudio. …….. 29

2. OBJETIVOS …….. 32
2.1 OBJETIVO GENERAL ……. 32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS …… 32

3. METODOLOGÍA …… 33
3.1 ESQUEMA METODOLÓGICO GENERAL ……..... 33
3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO …… 34
3.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN …….. 35
3.3 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS ……..… 35
3.4 EXTRACCIÓN DE DNA …… 35
3.5 EVALUACIÓN DE METILACIÓN ……..……. 36
3.5.1 Conversión del DNA ……... 36
3.5.2 PCR específica para metilación (MS-PCR): ……..... 37
3.6 EVALUACIÓN DE AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA ……..... 39
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO …….. 40

4. RESULTADOS ……..…… 41
4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ……..……..... 41
4.2 METILACIÓN DE PROMOTORES GÉNICOS ……..…..…….. 43
4.2.1 METILACIÓN EN PLASMA ……..…….....……. 43
4.2.2 METILACIÓN EN TEJIDO PULMONAR ……..……..... 44
4.2.3 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, PPV. NPV Y OD. …….. 46
4.2.4 CORRELACIÓN MUESTRAS PAREADAS ……..... 47

4.3 AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA ……..…… 49
4.3.1 VALIDACIÓN DEL ENSAYO ……. 49
4.3.2 RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN EN PLASMA ……..... 60
4.3.3 RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN EN PULMÓN ……..... . 62
4.3.4 ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS MARCADORES DE AMPLIFICACIÓN ……..... 59
4.3.5 CORRELACIÓN MUESTRAS PAREADAS….....….....…..... 67
4.4 CORRELACIÓN MARCADORES MOLECULARESY CARACTERÍSTICASCLINICOPATOLÓGICAS …..... 68

5. DISCUSIÓN ……..... 70
5.1 MARCADORES DE METILACIÓN ..... …… 70
5.2 AMPLIFICACIÓN ONGOGÉNICA ..... …… 72

6. CONCLUSIONES 75
7. RECOMENDACIONES ……. 77

BIBLIOGRAFÍA ……... 78

ANEXOS.
ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO 90
ANEXO 2. ENCUESTA A VOLUNTARIOS SANOS. 91
ANEXO 3. CONFIRMACIÓN DEL TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR PARA LOS GENES EN LOS QUE SE EVALUÓ METILACIÓN 93
ANEXO 4. VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE AMPLIFICACIÓN USANDO PCR MÚLTIPLEX. ……. 94
ANEXO 5. RESULTADOS DE METILACIÓN EN PLASMA SANGUÍNEO EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR …… 96
ANEXO 6. RESULTADOS DE METILACIÓN EN PLASMA SANGUÍNEO DE VOLUNTARIOS SANOS. …… 98
ANEXO 7. RESULTADOS DE METILACIÓN EN TEJIDO PULMONAR CON CÁNCER …….. 100
ANEXO 8. RESULTADOS DE METILACIÓN EN TEJIDO PULMONAR SANO ……..…… 102
ANEXO 9. RESULTADOS AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA OBTENIDOS DE PLASMAS Y PULMÓN PROVENIENTES DE PACIENTES CON CÁNCER ……..…….. 103
ANEXO 10. RESULTADOS AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA OBTENIDOS EN PLASMAS PROVENIENTES DE VOLUNTARIOS SANOS …105
ANEXO 11. RESULTADOS AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA OBTENIDOS EN TEJIDO PULMONAR NORMAL. ……..…… 106

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con cáncer de pulmón 34
Tabla 2. Cebadores usados para evaluar metilación ……. 38
Tabla 3. Secuencia de Cebadores y sondas Taqman usados para evaluar amplificación oncogénica ……. 39
Tabla 4. Características de voluntarios sanos …….. 41
Tabla 5. Características de controles tejido pulmonar ……... 42
Tabla 6. Detección de marcadores de metilación ……. 45
Tabla 7. Valores de sensibilidad, especificidad, PPV, CPV y OR de los marcadores de metilación en plasma sanguíneo…… 46
Tabla 8. Valores de sensibilidad, especificidad, PPV, CPV y OR de los marcadores de metilación en tejido pulmonar …….. 46
Tabla 9.Correlación del estado de metilación en muestras pareadas plasma-tumor …….. 48
Tabla 10. Obtención de valores ΔCT del gen EGFR respecto a β-actina 52
Tabla 11. Obtención de valores ΔCT del gen ERBB2 respecto a β-actina 54
Tabla 12. Obtención de valores ΔCT del gen AKT2 respecto a β-actina 56
Tabla 13.Obtención de valores ΔCT del gen MYCN respecto a β-ACTINA 58
Tabla 14.Obtención de valores ΔCT del gen MYCL respecto a β-ACTINA 60
Tabla 15. Número de copias encontrado para cada oncogén ……. 64
Tabla16. Número de copias génicas encontrado en las muestras pareadas TC-PC. …… 67
Tabla 17. Evaluación del plasma para predecir el estado de amplificación de los 6 genes encontrado en tumor …… 68
Tabla 18. Asociación de marcadores con características clinicopatológicas …… 69

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura interna de los pulmones …….. 17
Figura 2. Intercambio gaseoso en el pulmón. …….. 17
Figura 3. Metilación de Citosina …….. 24
Figura 4. DNMTs de mamíferos …….. 24
Figura 5. Esquema Metodológico General …….. 33
Figura 6. Porcentajes de metilación de los genes supresores tumorales de plasma sanguíneo …….. 43
Figura 7. Porcentajes de metilación de los genes supresores tumorales en tejido pulmonar …….. 44
Figura 8. Curva estándardel gen normalizador β-ACTINA……. 50
Figura 9. Curva de amplificación de EGFR ……... 51
Figura 10. Validación de ΔΔCT para EGFR …… 52
Figura 11. Curva estándar de ERBB2 …… 53
Figura 12. Validación de ΔΔCT para ERBB2 …… 54
Figura 13. Curva estándar de AKT2 …… 55
Figura 14. Validación de ΔΔCT para AKT2 …… 56
Figura 15. Curva estándar de MYCN …… 57
Figura 16. Validación de ΔΔCT para MYCN …… 58
Figura 17. Curva estándar de MYCL …… 59
Figura 18. Validación de ΔΔCT para MYCL …… 60
Figura 19. Caja y bigotes o Box and Whisker- Plasma Sanguíneo ……. 61
Figura 20. Caja y bigotes o Box and Whisker- Tejido Pulmonar ……. 63
Figura 21. Curvas ROC obtenidas para tejido pulmonar ……. 65
Figura 22. Curvas ROC obtenidas para plasma sanguíneo ……. 66

ABREVIATURAS (español-"inglés").

AAH: Hiperplasia Adenomatosa atípica "Atypicaladenomatous hiperplasia"
AD: Adenocarcinoma.
AKT2: v-AKT2 Oncogén homólogo 2 de timoma de murino. "v-AKT2 murine thymoma viral oncogene homolog 2"
APC: ColiPoliposisAdenomatoso. "Aadenomatouspolyposiscoli"
CDKN2A: Inhibidor 2A deQuinasa dependiente de ciclina. "Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A"
DIPNECH: Hiperplasia Difusa Idiopática Neuroendocrina. "Diffuse idiopathic neuroendocrine cell hyperplasia"
DNMT: DNA metiltranferasa "DNA methyltransferase"
ECM: Matriz extracelular "extracellularmatrix"
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. "Ethylenediaminetetraaceticacid"
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico. "Epidermalgrowth factor receptor":
ERBB2: Oncogén Homólogo 2 derivado de la Leucemia eritoblástica aviar.
FHIT: Triada histidina-frágil. "Fragilehistidine triad gene"
H&E: Hematoxilina-eosina "Hematoxylin-eosin"
HDAC: Histonas desacetilasas "HistoneDeacetylase"
HIF: Factor inducible por Hipoxia "Hypoxia inducible factor"
LCC: Carcinoma de células grandes"Largecell carcinoma"
MBPs: Proteínas de unión a metil-citosinas "Methylcytosine–bindingproteins"
MGMT: O-6-metilguanina-DNAmetiltransferasa. "O-6-methylguanine-DNA methyltransferase"
MMP: Metaloproteinasas "Metalloproteinases"
MS-PCR: PCR específica para metilación "Methylation-specific. PCR"
MYC: Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar. "V-mycmyelocytomatosis viral oncogenehomolog (avian)"
MYCL1: Oncogén viral homólogo 1 de Mielocitomatosis, derivado de cáncer de pulmón aviar. "v-mycmyelocytomatosis viral oncogenehomolog 1, lung carcinoma derived (avian)"
MYCN: Oncogén viral relacionado con Mielocitomatosis, derivado de neuroblastoma. "V-mycmyelocytomatosis viral relatedoncogene, neuroblastomaderived (avian)"
NPV: Valor predictivo negativo "Negativepredictivevalue"
NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas. "Non-small Cell Lung Cancer"
OR: Odss Ratio
PC: Plasma de pacientes con cáncer

PKB: Proteínas quinasas “Proteinkinases”
PPV: Valor predictivo positivo “Positive predictivevalue”
PS: Plasma de voluntarios sanos
RASSF1: Miembro 1 de la familia con dominio de asociación a Ras. “ Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1”
RFLP: Fragmentos de restricción“Restriction fragment length polymorphism”
RR: Riesgo relativo
SCC: Carcinoma de células escamosas Squamous-cell carcinoma
SCLC: Cáncer de pulmón de células pequeñas. “Small celllungcancer”.
TAC TomografíaAxialComputarizada
TC: Tejido pulmonar con cáncer
TIMP2: Inhibidor tisular de metaloproteinasa-2. **“**tissueinhibitor of metalloproteinases 2”
TS: Tejido pulmonar sano

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es desde 1985 la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en el mundo. Según las estadísticas de Globocan en el 2008 murieron 1.38 millones de personas por cáncer de pulmón, correspondiendo al 18,2% del total de muertes por cáncer[2].Esta alta tasa de mortalidad se debe principalmente a que el diagnóstico se realiza en estados avanzados de la enfermedad, donde las estrategias de tratamiento son limitadas y la sobrevida a 5 años no supera el 15%[3]. El principal factor de riesgo asociado a la carcinogénesis pulmonar es el consumo de cigarrillo que representa el 90% de los casos en mujeres y el 79% de los casos en hombres[4].El desarrollo de esta neoplasia se ha asociadotambién a la exposición a sustancias tales como asbesto[5],radón[6], arsénico, berilio, cromo, níquel, contaminación del aire, y radiación ionizante[7].

El cáncer de pulmón se clasifica según la organización mundial de la salud (OMS), en dos tipos histológicos: cáncer de pulmón de células pequeñas SCLC, y cáncer de pulmón de células no pequeñas NSCLC; este último, el más frecuente, se divide en tres subtipos histológicos: carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, y carcinoma de células grandes[8]. Cada uno de estos tipos histológicos presenta particularidades moleculares que están relacionadas con las características histológicas, clínicas, agresividad del tumor, respuesta a tratamientos y pronóstico de la enfermedad; lo cual señala la importancia de realizar estudios enfocados en la caracterización molecular y expresión génica en estas alteraciones[9].

Se ha descrito que existen diversos factores genéticos y epigenéticos que tienen lugar en la carcinogénesis general y en la pulmonar. Una de estas alteraciones es la amplificación oncogénica, es decir, el aumento en el número de copias de un gen, que generalmente conlleva a la sobreexpresión de la proteína codificada, y es uno de los eventos que se presenta en las primeras etapas del desarrollo del cáncer[10].Dentro de los cambios epigenéticos que influyen en el desarrollo de las neoplasias el mejor descrito es la metilación o adición de grupos metilo a citosinas presentes en islas CpGubicadas en regiones promotoras y primeros exones de genes, principalmente, supresores de tumores[11]; ésta metilación se asocia con un fuerte silenciamiento de la expresión génica[12]. Estas alteraciones moleculares se presentan en etapas tempranas del desarrollo del cáncer de pulmón y dan lugar a un genotipo que afecta la fisiología celular, generando autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis.

En esta investigaciónseevaluó en DNA libre en plasma de 55 pacientes colombianos, el estado de metilación de los promotores de los genes p16, FHIT APC, TIMP2, MGMT, RASSF1; como también, el grado de amplificación de oncogenes EGFR, ERBB2, AKT2, MYC, MYCN y MYCL1, por PCR en tiempo real como posible herramienta para ser utilizados como marcadores moleculares en pacientes con esta patología.

Además, se determinó si los resultados obtenidos en plasma corresponden a las características moleculares del tumor. Con estos resultados, se espera contribuir a la generaciónde métodos de diagnóstico poco invasivos, que permitan detectar el cáncer en etapas tempranas de su desarrollo, creando herramientas para disminuir las altas tasas de mortalidad de la enfermedad.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LOS PULMONES

1.1.1 ANATOMÍA Y FUNCIÓN PULMONAR

Los pulmones son dos órganos esponjosos del sistema respiratorio, ubicados en la caja torácica, uno a cada lado del corazón, separados por el mediastino, y recubiertos por un saco pleural seroso. El pulmón derecho tiene tres lóbulos: superior, medio e inferior, mientras que el pulmón izquierdo tiene dos lóbulos: superior e inferior. El lóbulo inferior de cada pulmón se apoya en el músculo diafragma el cual separa la cavidad torácica de la abdominal.

Como se observa en la **Figura 1.** Las vías respiratorias se ramifican dando lugar a vías cada vez más pequeñas:apartir de la tráquea, anivel de la carinase ramifican los bronquios principales derecho e izquierdo, cada bronquio se divide en bronquios lobares o secundarios, y cada uno de éstos en bronquios segmentarios o terciarios, las divisiones sucesivas de los bronquiosdan origen a los bronquiolos, que a diferencia de los bronquios carecen de cartílago y de glándulas submucosas en sus paredes. Hay 10 generaciones de bronquios y aproximadamente 15 de bronquiolos entre la tráquea y los alvéolos. Cada bronquiolo termina en 2 a 11 conductos alveolares, que a su vez emitan 5 o 6 sacos alveolares, revestidos por alvéolos. El alvéolo es la unidad básica para el intercambio gaseoso en los pulmones, son sacos de aire de aproximadamente 200 µm de diámetro, posee paredes delgadas que permiten el intercambio gaseoso de O_2 y CO_2, estas paredes están formadas por 2 tipos de células: neumocitos tipo I y tipo II.[13].

Los Neumocitos tipo I recubren el 95% de la superficie Alveolar, son células planas que permiten la eficiencia del intercambio aire-sangre, poseen escaso citoplasma, núcleos aplanados, pocas mitocondrias y organelos.

Los neumocitos tipo II ocupan del 5 al 10% de la superficie alveolar, son células redondeadas, con núcleos redondos, su citoplasma es rico en mitocondrias y en retículo endoplasmático liso y rugoso, también contiene vesículas compuestas por fosfolípidos, proteínas y glucosaminoglucanos, precursoras del surfactante pulmonar. El surfactante actúa como un detergente que reduce la tensión alveolar superficial, evitando el colapso de los alvéolos durante la expiración y facilitando la expansión de los pulmones durante la expiración[14].

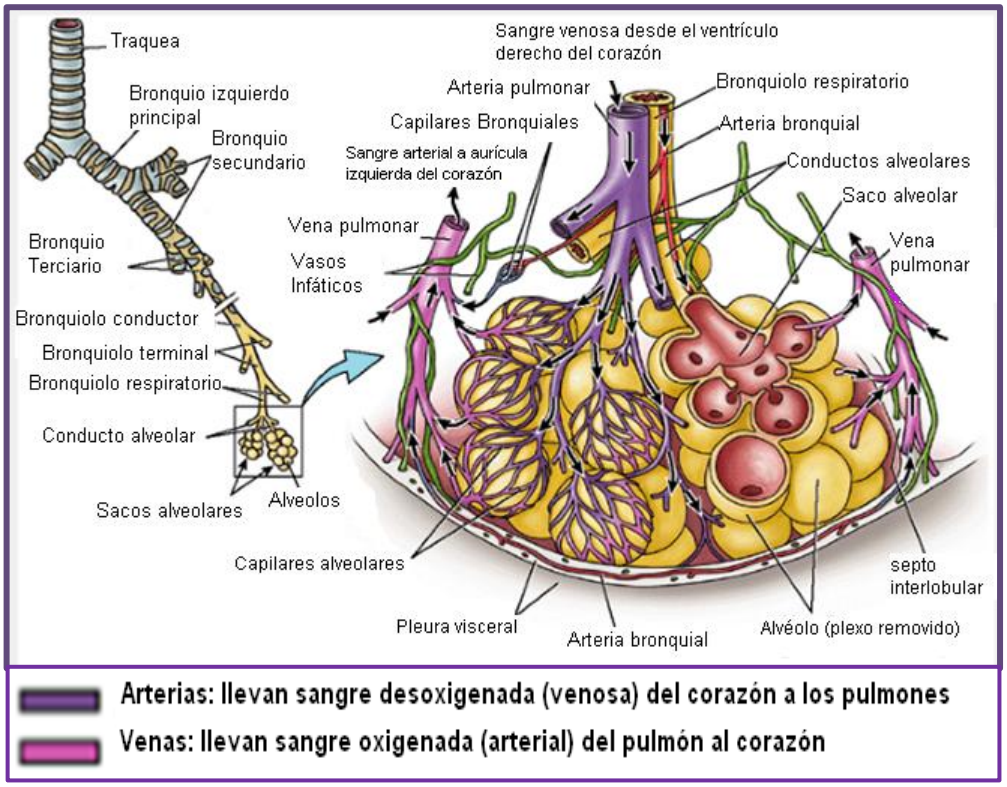


Figura1. Estructura interna de los pulmones. Tomado de Moore, Keith L.; Agur, Anne M. R.EssentialClinicalAnatomy, 3rd Edition , 2007, pág 78 [(15)].

La función principal de los pulmones es el intercambio gaseoso entre la sangre y la atmósfera. Cuando el aire atmosférico es introducido en los alvéolos durante la ventilación pulmonar, el oxígeno difunde al torrente sanguíneo y es transportado principalmente por la hemoglobina a los tejidos, donde es utilizado para la síntesis de sustratos energéticos de las células. Mientras que el CO_2 producto del metabolismo celular es expulsado a la atmósfera[(16)]**. Figura 2**

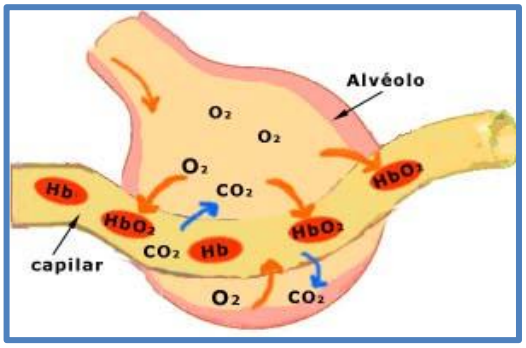


Figura 2.Intercambio gaseoso en el pulmón. Tomada de Carmen Eugenia Piña L http://www.unad.edu.co/curso_biologia/tejorgsist.htm[(17)]

1.1.2 EL EPITELIO RESPIRATORIO

El epitelio que recubre las vías respiratorias posee diferentes tipos de células:[18]

- **Células ciliadas**: son las más numerosas, se observan en cortes hitológicoscomoproyecciones filiformes que se proyectan desde la superficie celular apical. El movimiento coordinado de las cilias genera un barrido, el cual permite la expulsión de elementos extraños de las vías respiratorias.
- **Células caliciformes:** también llamadas células mucosas, porque son las encargadas de secretar moco, debido a que tienen gránulos demucinógeno en sus citoplasmas.
- **Células en Cepillo:**son células cilíndricas con microvellosidades, consideradas receptoras sensoriales.
- **Células con gránulos pequeños:**están dispersas entre los demás tipos celulares, tienen en el citoplasma gránulos que secretan diferentes sustancias, por ejemplo hay células se secretan catecolaminas, otras producen una hormona polipeptídica.
- **Células basales:**sonpequeñas, redondas y se encuentran sobre la lámina basal, son células de reserva, que permiten el remplazo de los demás tipos celulares del epitelio respiratorio.

1.2 CÁNCER DE PULMON

El cáncer de pulmón es la neoplasia con la mayor tasa de mortalidad en el mundo. Se desarrolla cuando las células pulmonares acumulan daños genéticos que promueven una proliferación celular descontrolada, generando parches clonalesque invaden tejidos adyacentes, y pueden producir metástasis a otros órganos del cuerpo. Los síntomas más comunes de esta neoplasia son: tos persistente, esputo con sangre, dolor torácico, dificultad para respirar, y en etapas avanzadas pérdida de apetito, adelgazamiento y debilidad[19].

1.2.1 LESIONES PRE-NEOPLÁSICAS

Las alteraciones celulares consideradas pasos intermedios en el desarrollo de la neoplasia maligna pulmonar se denominan lesiones pre-neoplásicas. A continuación se mencionan en orden de menor a mayor alteración[20].

- **Hiperplasia de células basales**: Es un aumento en el número de células basales, caliciformes o de ambas, que genera engrosamiento del epitelio.
- **Metaplasia escamosa**: La metaplasia es el remplazo de un tipo de célula madura por otra madura pero de tipo diferente. En este caso, se sustituye el epitelio superficial ciliado, por uno escamoso poliestratificado.

- **Displasia**: Se clasifica como leve, moderada, o severa, según el grado de alteración de las células del epitelio, atipia, estratificación y discontinuidad de la membrana basal.
- **Carcinoma in situ**:Es la máxima expresión de las alteraciones citológicas e histológicas mencionadas. Todo el espesor del epitelio está reemplazado por células atípicas, pero sin superar la membrana basal.
- **Hiperplasia adenomatosa atípica (AAH):**Es la proliferación atípica de neumocitos tipo II hiperplásicos, con núcleo hipercromático y citoplasma escaso, son lesiones que tienen un diámetro inferior a 5 mm.Se considera lesión precursora de adenocarcinoma y normalmente se encuentra adyacente a éste como lesión única o múltiple [(21)]. Se conoce también como hiperplasia de células alveolares, hiperplasia alveolar atípica o hiperplasia atípica alveolar de células cuboides. En AAH se han descrito alteraciones moleculares,entre ellas la pérdida de heterocigocidad en 3p, 9p, 17p, y mutaciones en el codón 12 de K-ras; tales alteraciones están asociadas a Adenocarcinoma Bronquioalveolar evidencia que apoya la idea de la lesión es precursora de éste tipo de cáncer.
- **Hiperplasia Difusa Idiopática Neuroendocrina (DIPNECH):**Son lesiones asociadas con el desarrollo de tumor carcinoide típico y atípico, y con lafibrosis bronquial obstructiva, se presenta comúnmente adyacente al tumor carcinoide, como hiperplasia reactiva en fibrosis de vías aéreas o inflamación[(22)].

1.2.2 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

El cáncer de pulmón generalmente presenta características morfológicas y moleculares de células epiteliales, por lo cual son clasificados como carcinomas.
Las dos formas histológicas más comunes, categorizadas por tamaño y apariencia de las células malignas, son: cáncer de pulmón de células pequeñas SCLC, y cáncer de pulmón de células no pequeñas NSCLC, que se presentan con una frecuencia aproximada del 16 y 80% respectivamente[(8).] El NSCLC comprende tres subtipos histológicos: carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, y carcinoma de células grandes. Las diferentes clasificaciones histológicas presentan etiologías y características clínicas,relacionadasen gran medida con las particularidades moleculares del tumor, lo cual demuestra la importancia de realizar estudios enfocados haciala caracterización molecular y expresión génica en estas alteraciones[(9).]

El SCLC habitualmente empieza a desarrollarse en bronquios primarios y secundarios, crece rápidamente alcanzando gran tamaño, generando metástasis temprana extratoráxica, siendo clínicamente agresivo[(23).] Sus células poseen gránulos que contienen hormonas neuroendocrinas, por lo que usualmente se asocia con síndrome endocrino o paraneoplásico[(24)]. Adicionalmente se ha demostrado que está estrechamente relacionado con el consumo de cigarrillo[(25), (1)] y a pesar de que responde a tratamiento con quimioterapia los pacientes con

SCLC tienen un mal pronóstico porque este tipo de cáncer frecuentemente se detecta en etapas avanzadas[26].

En cuanto alos subtipos histológicos de**NSCLC**:

El **Adenocarcinoma**–AD-usualmente se origina en tejido periférico del pulmón y sufre metástasis temprana, su aparición se ha asociado a cambios en los hábitos de fumar, patrones alimenticios, factores ambientales y factores ocupacionales.Histológicamente son altamente heterogéneos,presentan un patrónacinar, papilar, o mixto, y son productores de mucina[22].

El **Carcinoma de células escamosas –SCC-** (Squamous-cell carcinoma)conocido como carcinoma epidermoide, usualmente se origina en un bronquio central, con tendencia a localizarse en el área central del pulmón, su crecimiento es lento, por lo que tiene menor probabilidad de presentar metástasis. Produce frecuentemente una sustancia llamada queratina, la cual se observa como perlas incrustadas en el tejido, y presenta puentes intracelulares (desmosomas)[27].

El **Carcinoma de células grandes** –LCC- (largecell carcinoma) se caracteriza por tener células altamente indiferenciadas, que no tienen evidencia de queratinización, ni diferenciación escamosa, pero por su tamaño se clasifican como Células Grandes. Este tipo de cáncer se desarrolla en cualquier parte del pulmón y tiene un pronóstico generalmente menos favorable que las otras formas de NSCLC[24].

1.2.3 FACTORES DE RIESGO

El consumo de cigarrillo es el principal factor de riesgo conocido para todos los tipos histológicos de cáncer de pulmón[28]. Según estadísticas de la sociedad Americana del Cáncer existe en fumadores un riesgo relativo (RR) de padecer cáncer de pulmón 10 a 30 veces mayor comparado con no fumadores. El cigarrillo está directamente relacionado en el 90% de los casos en mujeres y en el 79% en hombres[4]; tan sólo el 15% de los casos en total, corresponde a personas no fumadoras[29]. La probabilidad de que un fumador desarrolle cáncer de pulmón se ve afectada por la edad en la que empezó a fumar, el tiempo que lleva fumando, la cantidad de cigarrillos diarios y la fuerza con la que inhala el cigarrillo[30]. El desarrollo de la neoplasia también se asocia a predisposiciones genéticas[31], a la exposición a asbesto[5], radón[6],arsénico, berilio, cromo, níquel, contaminación del aire y radiación ionizante[7], siendo la exposición a asbestos el factor de riesgo ocupacional más común con un RR=6 [4].

1.2.4 HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN

Actualmente el cáncer de pulmón se diagnostica por medio de algunas de las siguientes técnicas:[32].

- **Radiografía de tórax:** Genera imágenes características o sugestivas de la localización y tamaño del tumor. detecta el 75% de los cánceres de pulmón.. Posee muchas de las características requeridas para una prueba e tamizaje. Esta ampliamente disponible, tiene bajo costo, es aceptada por los pacientes y tiene bajo riesgo. Sin embargo su sensibilidad, especificidad y valor predictivo no son los deseados. La exactitud de la radiografía de tórax está limitada por las capacidades de la tecnología y la variabilidad del observador. Por lo general es el primer examen que se realiza.
- **Tomografía axial computarizada**: Es una prueba radiológica que produce imágenes detalladas de cortes axiales del cuerpo, las imágenes son creadas por una computadora y son de gran utilidad para detectar nódulos pulmonares malignosde tamaño pequeño y determinar el grado de extensión de la neoplasia; tanto intratoráxica como extratoráxica.
- **Citología de esputo**, es el análisis de los componentes celulares encontrados en el esputo (macrófagos, leucocitos, células escamosas, cilíndricas, caliciformes y cuboidales). Es un método poco invasivo pero con una sensibilidad del 71% para tumores centrales y menos del 50% para tumores periféricos. Es una herramienta menos sensible que la radiografía de tórax.
- **Toracentesis**, se refiere a la inserción de una aguja o catéter en la cavidad pleural con el fin de extraer líquido y hacer un análisis de los componentes celulares. Tiene una sensibilidad del 80%, pero es un procedimiento más invasivo que los mencionados anteriormente.
- **Broncoscopia**: con o sin aguja de aspiración, permite observar el interior de la tráquea y las vías respiratorias mayores del pulmón y determinar si existen áreasanormales. Tiene una sensibilidad del 88% para tumores centrales y 60 a 70% para tumores periféricos, aunque la orientación con tomografía computarizada (TC) mejora la sensibilidad en tumores periféricos.
- **Biopsia por aspiración con aguja fina** insertada en el tumor a través del pecho para extraer una muestra de tejido o líquido, tiene una sensibilidad del 90% para tumores periféricos, generalmente es guiada por TC.

Ninguno de estos procedimientos detecta los primeros cambios moleculares que conducen al tejido pulmonar hacia un fenotipo maligno, por lo general el diagnóstico se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando ya está establecido el tumor o cuando hay invasión y metástasis. Teniendo en cuenta que las altas tasas de mortalidad reportadas en cáncer de pulmón, se deben principalmente al diagnóstico tardío, es necesario combinar las técnicas usadas actualmente, con el uso de marcadores moleculares que confirmen la presencia

de células neoplásicas en las primeras etapas de la enfermedad y predecir su respuesta biológica ante tratamientos concretos[33].

1.2.5DETECCIÓN DE CÁNCER DE PULMÓN EN PLASMA

Numerosos estudios reportan que los pacientes con cáncer presentan incremento en la cantidad de DNA libre en fluidos biológicos como suero, plasma, y esputo[34], existe evidencia de que el origen de este DNA es el tejido tumoral, principalmente células que han sufrido apoptosis o necrosis [35]. Así mismo, se ha observado que el tamaño de los fragmentos de DNA libre en plasma de personas con cáncer es mayor que el de personas sanas[36], y que en ellos se pueden detectar las alteraciones genéticas del tumor, entre ellas amplificación oncogénica y metilación de genes supresores de tumores[37], [38], por lo que se ha postulado al plasma como una muestra biológica adecuada para ser usada en el diagnóstico del cáncer de pulmón[39], [40]. La ventaja del análisis de biomarcadores en muestras de sangre, es la facilidad de obtener y procesar las muestras y la mínima invasividad que presenta para el paciente.

1.2.6ORIGEN MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón al igual que el resto de neoplasias es producto de múltiples etapas donde hay acumulación de alteraciones genéticas. Es así, que los tumores se desarrollan por un proceso de evolución clonal dirigido por mutaciones, donde la célula acumula un número suficiente de mutaciones hasta hacerse maligna, formando parches clonales, invadiendo tejidos vecinos y generando metástasis a otros órganos. El hecho de que la mayoría de los tipos de cáncer ocurran en personas de edad avanzada se explica por las décadas requeridas para acumular el número de mutaciones necesarias para causar malignidad[41].

Dentro de los eventos moleculares tempranos que se dan en el desarrollo del NSCLC se encuentran alteraciones cromosómicas que afectan generalmente las regiones 3p, 9p y 17p[42]. También se ha observado pérdida de heterocigocidad en la región: 3p21.3 que corresponde al gen efector de la proteína RasRASSF1A; igualmente en 3p14.2 locus de FHIT "*fragilehistidine triad*"[43], mutaciones en p53, amplificación génica de la familia Myc, e inestabilidad de microsatélites[44], [45].

Dependiendo del tipo histológico existen diferentes alteraciones genéticas. Por ejemplo las deleciones en 3p son más extensas en carcinoma escamocelular que en adenocarcinomas. También se encuentran diferencias genéticas respecto a personas fumadoras y no fumadores que han desarrollado la neoplasia. Así, las mutaciones en EGFR están relacionadas principalmente con el desarrollo de adenocarcinomas en no fumadores, mientras que mutaciones en KRAS están más asociadas a fumadores[46].

El desarrollo de la neoplasia no solo está influenciada por cambios en las secuencias de DNA, también se dan cambios epigenéticos que contribuyen al desarrollo y expansión de clones malignos. En general el término epigenética se refiere al estudio de cambios en la expresión génica que se presenta sin que haya cambios en la secuencia de DNA, por lo que son estados potencialmente reversibles. Estos procesos epigenéticos involucran cambios en el patrón de acetilación, fosforilación, ubiquitinación de histonas, es decir, cambios en el código de histonas. Pero la alteración epigenéticamás estudiada es la adición de grupos metilo a las citosinas presentes en islas CpG de regiones promotoras, principalmente de genes supresores tumorales. La metilación está asociada fuertemente con el silenciamiento de la expresión o inactivación génica ya que alrededor de los grupos metilo, hay una interacción de proteínas que generan condensación del DNA y por lo tanto lo hacen inaccesible a factores de transcripción[47],
Todas estas alteraciones dan lugar a un genotipo que afecta la fisiología celular generando autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis continua, invasión y finalmente metástasis.

1.2.6.1 Metilación Aberrante en Regiones Promotoras de Genes Supresores Tumorales.

Los fenómenos epigenéticos son aquellos que confieren cambios heredables en el patrón de expresión génica, sin que haya alteración de la secuencia de DNA. La regulación epigenética de la expresión génica es crítica para el desarrollo de los organismos y la diferenciación celular y es un elemento clave en el desarrollo del cáncer[48]. Los mecanismos bioquímicos de la regulación epigenética son complejos, pero se encuentran organizados a través de la estructura espacial del DNA y cambios en la estructura de la cromatina. Estos cambios se llevan a cabo a través de las interacciones de la maquinaria de metilación y de la familia de proteínas *Polycomb-Thrytorax (Pcg- TrxG)*[49], [50].

La metilación de promotores es conocida como un mecanismo de silenciamiento génico[11], los sitios blanco de metilación son principalmente áreas con una extensión de más de 500 pares de basesque tienen un porcentaje de guaninas y citosinas mayor al 55%, éstas regiones reciben el nombre de islas CpG, y se ubican frecuentemente en el promotor y primeros exones de muchos genes que en ausencia de un proceso neoplásico normalmente están poco metilados o no lo están[11],[51]. Los cambios en los patrones de metilación son controlados por enzimas llamadas DNA metiltranferasas (DNMTs) quienes catalizan la transferencia de un grupo metilo del S-adenosil metionina a la posición 5’ de la citosina implicada (Figura 3).

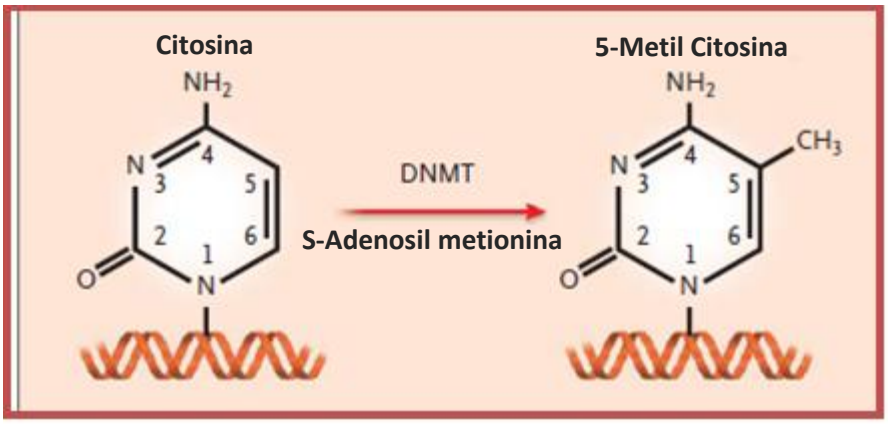


Figura 3.Metilación deCitosina. Las DNA metiltransferasas (DNMTs) catalizan la metilación de la posición 5 de la citosina, usando S-adenosil – metionina como molécula donadora del grupo metilo (CH_3). Modificada de NEngl JMed349;21november20, 2003 www.nejm.org[52].

En mamíferos se han identificado cuatro DNMTsdenominadas: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L, que comparten motivos estructurales altamente conservados. Según su función se clasifican como: (figura 4)

DNMTs de novo:dentro de este grupo se encuentra DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L**,** las cualesno requieren un DNA hemimetilado para generar un patrón de metilación. Son responsables de la metilación en el desarrollo embrionario temprano.

DNMT de mantenimiento: ComoDNMT1 que requiere un DNA hemimetildo para conservar ese patrón de metilación, por lo tanto participa en la replicación y transmisión estable del patrón de metilación a las células hijas durante la división celular[53].

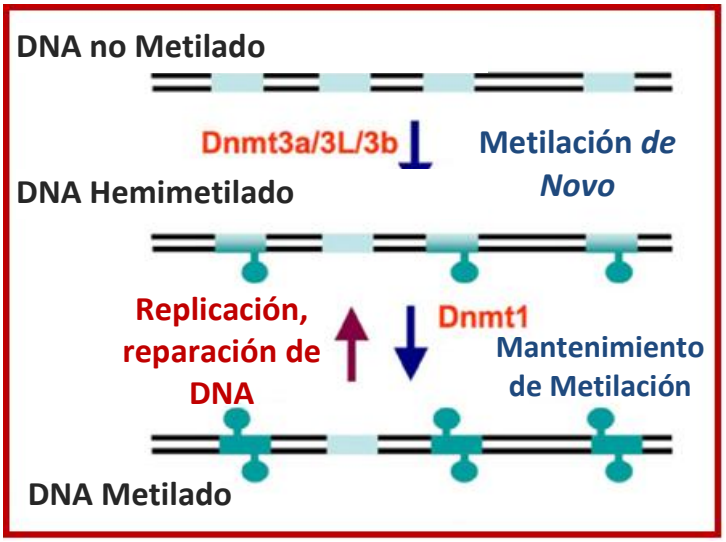


Figura 4. DNMTs de mamíferos. DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L generan metilación de Novo y DNMT1 mantiene patrones de metilación. Los círculos grises representan los grupos metilo. Modificada de *Structure 16, March 2008*(54).

DNMT1 se ha descrito como el factor principal en la metilación de promotores de células neoplásicas y su consecuente silenciamiento génico[55]. Sin embargo investigaciones recientes han revelado que las DNMTs pueden contribuir a la represión de la expresión génica por mecanismos diferentes a la metilación, como la interacción con Histonas desacetilasas(HDAC), promoviendo la desacetilación de las histonas lo cual genera un DNA más compacto, que hace a las secuencias promotoras inaccesibles al sistemadetranscripción celular[56].

La metilación de promotores génicos se detecta tanto en tumores como en el DNA libre en plasma de pacientes con cáncer, así como en muestras de esputo y lesiones precursoras de carcinomas pulmonares [57], [58], [59]. Algunas de las alteraciones epigenéticas son propias de lesiones preneoplásicas, por lo que podrían diseñarse estrategias de diagnóstico temprano basadas en marcadores de metilación.

1.2.6.2 Genes metilados frecuentemente en cáncer de pulmón incluidos en este estudio:

Los genes evaluados en este estudio,seescogieron teniendo en cuenta observaciones previas generadas por el grupo de investigación de Farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia, donde se encontró metilación de éstos genes en tumores pulmonares de colombianos. También se tuvieron en cuenta, reportes a nivel internacional, donde postulan estos genes como marcadores moleculares del cáncer de pulmón,debido a sus altas frecuencias de metilación en esta patología. Los genes seleccionados fueron:

FHIT: "*FragileHistidine Triad"* Es un miembro de la familia de genes "*histidine triad"*, localizadoen el sitio frágil (FRA3B) 3p14.2, contiene 1.502.089bases[60], comprende 10 exones, codifica para una proteína supresora de tumor denominada hidrolasa dinucleósidotrifosfato 5', de 147 aminoácidos[61], la cual cataliza la hidrólisis de diadenosinatrifosfato a adenosina mono y difosfato. Por lo tanto cuando se pierde o se silencia este gen, se acumula diadenosinatrifostato estimulando la síntesis de DNA y favoreciendo la proliferación celular [62]. Esta proteína también participa en el control del ciclo celular por degradación de ciclinas de la fase S[63]. Así mismo, se encuentra involucrada en vías de señalización que se activan en respuesta a estrés celular[61].

En cáncer de pulmón se ha visto pérdida de heterocigocidad de este gen especialmente asociada a fumadores, sugiriendo que se afecta con los carcinógenos del tabaco[64]. Un estudio realizado en 2002 donde examinan la expresión de la fragilidad en fumadores, en no fumadores y en pacientes con

SCLC, demuestra que el sitio FRA3B es sensible al cigarrillo, ya que los fumadores tienen mayor fragilidad en este sitio, comparados con los otros grupos estudiados, incluyendo los que han dejado de fumar. Esto sugiere que la exposición al tabaco incrementa la fragilidad en este sitio y que este proceso es reversible[65].

También se ha observado hipermetilación del promotor, principalmente en carcinoma escamo-celular, asociada con exposición a tabaco y metilación de p16.[66]. Otros resultados[67] sugieren que la metilación de FHIT puede funcionar como un marcador pronóstico para el progreso del cáncer de pulmón ya que su pérdida de expresión muestra una fuerte asociación con una sobreviva corta, tanto en adenocarcinomas, como en carcinoma escamocelular[68].

P16: Gen localizado en 9p21, tiene una extensión de 30Kb, contiene 3 exones[69]. También se conoce como CDKN2A "*Cyclin-DependentKinaseInhibitor 2A*" este gen genera por *splicing* alternativo dos proteínas que regulan el ciclo celular, la primera p16 (INK4) es un inhibidor de kinasas dependientes de ciclina, y p14 (ARF), se une a MDM2 proteína que estabiliza p53[70].Desde 1994 se obtuvieron las primeras evidencias de su función supresora de tumor, cuando se observaron deleciones homocigotas en el locus correspondiente a este gen en líneas celulares de cáncer de pulmón, mama, hueso, piel, vejiga, riñón, y ovario[71]. Luego se determinó que p16 genera la detención del ciclo celular en G1, inhibiendo que las kinasas dependientes de ciclinas CD4 y CD6 fosforilen la proteína Rb, por lo tanto deleciones, mutaciones o silenciamiento de p16 puede resultar en un crecimiento celular anormal.
La pérdida de expresión de p16 ocurre en el 50–60% de los carcinomas de célula no pequeña (NSCLCs), bien sea mediante deleción (20%), mutaciones puntuales (5–10%) o metilación (20%)[72]. La metilación de p16 puede detectarse en lesiones precursoras[59] y en el 20% de los individuos sanos en riesgo de desarrollar cáncer[73]. Así mismo, la metilación de p16 está asociada a recurrencia temprana de la neoplasia después de resección quirúrgica, independientemente del estado del cáncer, edad, sexo, raza, características histológicas del tumor, y hábito de fumar[74].

RASSF1A: "*Ras AssociationDomainFamilyMember 1*" Es un gen localizado en 3p21.3, con un tamaño de 11.165 bases, contiene 5 exones los cuales codifican para 344 aminoácidos que conforman una proteína efectora de RAS[75]. RASSF1 inhibe la acumulación de ciclina D1 y así detiene el ciclo celular, proceso que es reversible al expresar ectópicamente ciclina D1 u otros proteínas corriente abajo, que activen la transición de la fase G1 a S como ciclina A y E7[76].

En líneas celulares de fibroblastoma de ratón y de NSCLC, se observó que RASSF1 interactúa con E4F1, una fosfoproteína involucrada en la progresión del ciclo celular. CuandoE4f1 forma complejos proteicos con RASSF1A lleva a la

detención del ciclo en fase G1 e inhibición de la fase S, por lo tanto, cuando la proteína RASSf1A no se está expresando hay un desequilibrio a favor de la división celular. Así mismo, se ha observado, en ensayos con ratones desnudos que su reexpresión inhibe la formación de tumores indicando su función como gen supresor de tumor[77]. De igual manera, la metilación de RASSF1A está asociada a recurrencia temprana de la neoplasia después de resección quirúrgica, y algunos autores señalan que los niveles de metilación de este gen se observan con una frecuencia más alta en hombres que en mujeres[78].

APC: "*Adenomatosis PolyposisColi*" Localizado en 5q21-q22, compuesto por 108.353 bases, contiene 15 exones que codifican para 2.843 aminoácidos. La proteína se encuentra localizada en el citoplasma[79]y cumple una función importante en la supresión de tumores, regulando la señalización de WNT, promueve la degradación de la ß-catenina, impidiendo su entrada al núcleo y la expresión de genes que estimulan la proliferación celular[80]. La pérdida de la función de APC lleva a una inapropiada activación de esta vía de señalización contribuyendo a la progresión de cáncer; también participa en la migración celular, adhesión, segregación cromosómica, apoptosis y diferenciación neuronal[81].

Este gen se encuentra frecuentemente metilado en cáncer, incluyendo cáncer de pulmón. Algunos resultados muestran que especialmente 2 sitios CpG (794, 797), pueden unirse a proteínas que regulan la expresión de APC; incluso se ha postulado para el tratamiento de cáncer de pulmón químicos como 5-aza-2-deoxicitidina que promueven la desmetilación de APC en la línea celular NCI-H460[82]. La metilación del promotor de APC es un cambio preneoplásico que puede estar asociado a la exposición a tabaco, por lo tanto se ha sugerido que la detección en sangre, de la metilación de éste gen, es de utilidad para el monitoreo y detección de cáncer en estados tempranos de NSCLS[83].

TIMP2: "*TissueInhibitor of Metalloproteinase2*" gen localizado en 17q25, contiene 5 exones, codificapara una proteína que funciona como un inhibidor natural de metaloproteinasas(MMP) un grupo de endopeptidasas involucradas en la degradación de la matriz extracelular (ECM)[84].Timp2 también inhibe la migración de células endoteliales y bloquea la liberación de factores angiogénicos unidos a la ECM

En diferentes tipos de cáncer se ha descrito disminución en la expresión de TIMP2 asociada tanto a polimorfismos genéticos como a mecanismos epigenéticos (hipermetilación del promotor)[85].

MGMT: "*O-6 -Methylguanine-DNA Methyltransferase"* Localizado en 10q26[86]comprende 299.903 bases, que codifican para 207 aminoácidos. MGMT, acepta grupos alquilo y remueve aductos del DNA causados por O-6-alquilguanina, un importante mutagénico y carcinogénico que induce lesión en DNA durante la replicación por simple alquilación con preferencia por timina.

El promotor de este gen se ha visto frecuentemente metilado en diferentes neoplasias como glioblastomas[87], cáncer de testículo [88], y de pulmón[89]. En un estudio realizado en China, con individuos expuestos a emisiones de humo de carbón, en el cual se evaluó en esputo el valor pronóstico de la metilación del promotor de cuatro genes incluyendo a MGMT, observaron que MGMT está metilado en 17.9% de los individuos que están expuestos a estas emisiones de carbón consideradas un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de pulmón[90].

También se ha relacionado la metilación del promotor de MGMT con una transición G:C—A:T del gen p53 en cáncer de pulmón y otros patrones de mutación en este mismo gen, además la metilación de MGMT se encuentra con mayor prevalencia en hombres no fumadores[91].

Análisis de DNA en suero de pacientes con silicosis que tienen un alto riesgo de padecer cáncer de pulmón, muestran una frecuencia alta de metilación en genes como RASSF1, p16, MGMT, indicando que la detección de estos cambios epigenéticos en suero, facilitan la detección temprana de cáncer de pulmón.

1.2.6.3 Amplificación Oncogénica

Los oncogenes codifican proteínas que controlan el ciclo celular y/o la proliferación, pueden sufrir alteraciones estructurales, como mutaciones y fusiones o por amplificación[92].

La amplificación génica es el incremento en el número de copias de un gen o región de un cromosoma. Prevalece en algunos tumores y se asocia comúnmente con sobreexpresión de los genes implicados. El DNA amplificado se puede organizar como elementos extracromosomales, como unidades repetidas de un simple locus o dispersas a través el genoma[93]. La amplificación se da generalmente en los sitios frágiles, se promueve por defectos en la replicación del DNA, o mal funcionamiento de la telomerasa, se considera una de las rutas moleculares por las cuales se activa el potencial oncogénico de los protooncogenes celulares y es un reflejo de la inestabilidad genética de la célula tumoral[10].

Se ha descrito amplificación oncogénicaen lesiones preneoplásias, y tumores establecidos, y se ha demostrado que existe una importante diferencia entre las regiones amplificadas en carcinoma escamocelular y adenocarcinoma. Esto sugiere que hay una diferencia en el nivel de la inestabilidad genómica y/o en los mecanismos por los cuales progresa cada tipo histopatológico[10].

1.2.6.4 Genes amplificados frecuentemente en cáncer de pulmón incluidos en este estudio.

Los genes de amplificación analizados en este estudio fueron seleccionados teniendo en cuenta la base de datos de "Cancergenome Project" del instituto Sanger (http://www.sanger.ac.uk/). Donde reportan los siguientes genes amplificados en cáncer de pulmón:

EGFR: "*EpidermalGrowth Factor Receptor***"** localizado en la región 7p12.3-p12.1, contiene 28 exones[94], e importantes elementos repetitivos SINEs y LINES.Tras la unión a su ligando, EGFR forma homo o heterodímeros con alguno de los otros tres receptores de la misma familia (ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4) y activan vías de señalizacióncomo Ras-Raf-Mek y PI3K-AKT2-mTOR(Figura 5), involucradas en proliferación, diferenciación, sobrevida celularyangiogénesis tumoral dependiente o independiente del HIF (Factor inducible por Hipoxia)[1].Es importante para el desarrollo de muchos tejidos incluyendo piel, pulmón, intestinos y esqueleto craneofacial[95].

Se han identificado mutaciones en el dominio quinasa de EGFR en adenocarcinoma de pulmón en aproximadamente 10% de pacientes Estadounidenses y 30 a 50% en pacientes Asiáticos[96]. Estas mutaciones ocurren frecuentemente en mujeres y no fumadores y son asociadas con sensibilidad a los inhibidores Gefitinib y Erlotibib[97].

Este gen se ha descritoamplificadocon una frecuencia de 30% en carcinoma escamocelular y 15% en adenocarcinoma de pulmón[98], su amplificación se asocia a una mejor respuesta a inhibidores de EGFR[99]. También se detecta amplificado en displasia, especialmente de alto grado, la cual es asocia con alto riesgo de cáncer de pulmón.

ERBB2:"Oncogén Homólogo 2 derivado de la Leucemia eritoblástica aviar". También se conoce como HER2 o NEU, se localiza en 17q21.1, codifica para un receptor de membrana de la misma familia de EGFR. La amplificación simultánea de los dos receptores se correlaciona con una mala evolución de la enfermedad en NSCLC[100].

Se han identificado Mutaciones y amplificación de ERBB2 en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. La frecuencia de estas mutaciones es inferior al 5%, y la frecuencia de la amplificación es de 5 a 10%. Las mutaciones del dominio quinasa de ERBB2al igual que en EGFR se asocian con el sexo femenino, y no fumadores. Y la amplificación tambiénse asocia con la sensibilidad a inhibidores tirosinquinasa[101].

AKT2: Gen localizado en 19q13.1-q13.2.Codifica para una proteína perteneciente a la familia de proteínas quinasascompuesta por tres isoformas altamente

homólogas: AKT21 (PKBα), AKT2 (PKBβ) y AKT23 (PKBγ).LasproteínasAKT2 (PKB) son reguladoras de la fisiología humana controlando una impresionante gama de funciones celulares, incluyendo la modulación del crecimiento, la supervivencia, proliferación y el metabolismo[102].

AKT2 hace parte de la vía de señalización *PI3K–AKT2–mTOR*, la cual está corriente debajo de EGFR (Figura 5.) Vía que se activa tempranamente en la carcinogénesis de pulmón y que al inhibirse induce apoptosis de células de pulmón premalignas y malignas en modelos animales. AKT2se ha vistosobreexpresado en displasia bronquial[1] y amplificado en cáncer de ovario[103], páncreas[104] y pulmón[105].

FAMILIA DE GENES MYC: Familia conformada por los genes MYC, MYCN (aislada de neuroblastoma), y MYCL1 (aislada de cáncer de pulmón), codifican una serie de factores de transcripción que activan la síntesis de DNA, el metabolismo del RNA y la progresión del ciclo celular. En carcinoma de pulmón se han detectado alteraciones en los tres miembros de la familia. El mecanismo general de alteración es la amplificación y por lo tanto su sobreexpresión protéica[106], correlacionada con la regulación de un set de genes, principalmente proapoptóticos y antiapoptóticos. Soportando la idea de un balance alterado de la apoptosis en SCLC regulado en parte por la familia de genes Myc[107].

Los oncogenes de la familia MYC tienen la capacidad de cooperar con otros oncogenes como Ras y Bcl-2 en relación con diversos procesos implicados en la tumorigénesis[108],[109].

El impacto terapéutico y el efecto de la inhibición sistémica de la familia Myc, se han analizado en un modelo de ratón con adenocarcinoma de pulmón inducido por Ras, comprobando que la inhibición de estos factores de transcripción provoca una rápida regresión de tumores nacientes y establecidos en pulmón, lo que indica que participan en el mantenimiento de tumores in-vivo, dependientes de Ras. Igualmente observaron que esta inhibición tiene un efecto negativo en la regeneración de tejido normal, sin embargo estos efectos son bien tolerados y completamente reversibles, demostrando la eficiencia de inhibición de MYC, MYCN y MYCL1 en la terapia de cáncer de pulmón[110].

MYC: "*AvianMyelocytomatosis Viral OncogeneHomolog*" o c-Myc, ubicado en 8q24.12-q24.13, contiene tres exones[111]. El gen MYC codifica un factor de transcripción pleiotrópico con estructura bHLHZ (*basic-Hélice-Loop-Hélice/leucine-Ziper*)que coordina la expresión de diversos programas intra y extracelulares necesarios para el crecimiento y expansión de células somáticas[112].

MYC promueve la proliferación y transformación celular por activación de genes involucrados en crecimiento celular. Induce transcripción de los genes E2F1, E2F2 y E2F3 y así mismo requiere de éstos para inducir las células a fase S (E2f2

o E2f3) y a apoptosis (E2f1)[113]. Para que MYC pueda realizar activación génica requiere formar un complejo heteromérico con proteínas MAX y MAD, este complejo se une a secuencias E-box (5' -CACGTG-3'), el reconocimiento de las cajas E-box determina si la célula se divide y prolifera (MYC-MAX) o si se diferencia y entra en quiescencia. La desregulación de MYC ha sido implicada en el desarrollo de muchos cánceres humanos, incluyendo linfoma de Burkitt, neuroblastomas, y cáncer de pulmón[114].

Se ha demostrado que también participa en el control de la replicación de DNA, interactuando con complejos pre-replicativos. La sobreexpresión de MYC causa incremento de actividad en los orígenes de replicación con subsecuente daño del DNA y activación de puntos de chequeo[115].

La proteína MYC es sobre expresada en varios cánceres humanos como de mama, de colon, carcinoma hepatocelular, tumores hematológicos y cáncer de pulmón[116].

MYCN: "*AvianMyelocytomatosis Viral-RelatedOncogene, Neuroblastoma-Derived*" ubicado en 2p24.1. Compuesto por 6.447 bases, codifica 464 aminoácidos, que conforman este factor de transcripción, miembro de la familia Myc, es una proteína nuclear, al igual que MYC forma heterodímeros con la proteína MAX Esta interacción es esencial para la activación transcripcional, inducción de la progresión del ciclo celular, y transformación celular[117].

Se ha demostrado que MYCN puede sustituir la función de MYC durante la embriogénesis, indicando que los dominios funcionales de MYCN son implícitamente idénticos a los de MYC[116].

MYCN se ha visto amplificado de 25 a 700 veces en 8 de 9 líneas celulares de neuroblastoma, también se ha visto amplificado en retinoblastoma, y cáncer de pulmón [118].

MYCL1: *AvianMyelocytomatosis Viral OncogeneHomolog 1, Lung Carcinoma-Derived.* Gen localizado en 1p34.3, compuesto de 3 exones[119]. Miembro de la familia Myc, homólogo de MYCN y MYC. Se ha asociado a las mismas funciones de éstos, principalmente regulación del ciclo celular, proliferación, apoptosis, diferenciación celular[116].
Se ha visto sobreexpresado en cáncer de pulmón y se correlaciona con la regulación de varios genes con funciones neuronales conocidas como NEFL, PRSS12, HPCAL4[107].
Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) en MYCL1 en cáncer de pulmón, indican que este gen puede ser un marcador de metástasis[42].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar en DNA libre en plasma de pacientes con cáncer de pulmón atendidos en cuatro hospitales de Bogotá, el estado de metilación de genes supresores tumorales y amplificación de oncogenes, y explorar su utilidad en el diagnóstico molecular de la enfermedad.

2.2 ESPECÍFICOS

- Evaluar el estado de metilación del promotor de los genes supresores tumorales p16, FHIT, APC, TIMP2, MGMT, RASSF1, en DNA proveniente de plasma, de tejido pulmonar normal y tumoral, de pacientes colombianos con cáncer de pulmón.
- Detectar el grado de amplificación de los oncogenes MYC, MYCN, MYCL1, EGFR, en DNA proveniente de plasma, de tejido pulmonar normal y tumoral, de pacientes colombianos con cáncer de pulmón.
- Correlacionar el estado de metilación del promotor de los genes supresores tumorales p16, FHIT, APC, TIMP2, MGMT, RASSF1A y amplificación de MYC, MYCN, MYCL1, EGFR, con los tipos histopatológicos de cáncer pulmonar y con las variables edad y sexo, mediante el análisis de la historia clínica.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de los marcadores propuestos para discriminar tejido normal de tejido tumoral.

3. METODOLOGÍA

3.1 ESQUEMA METODOLÓGICO GENERAL

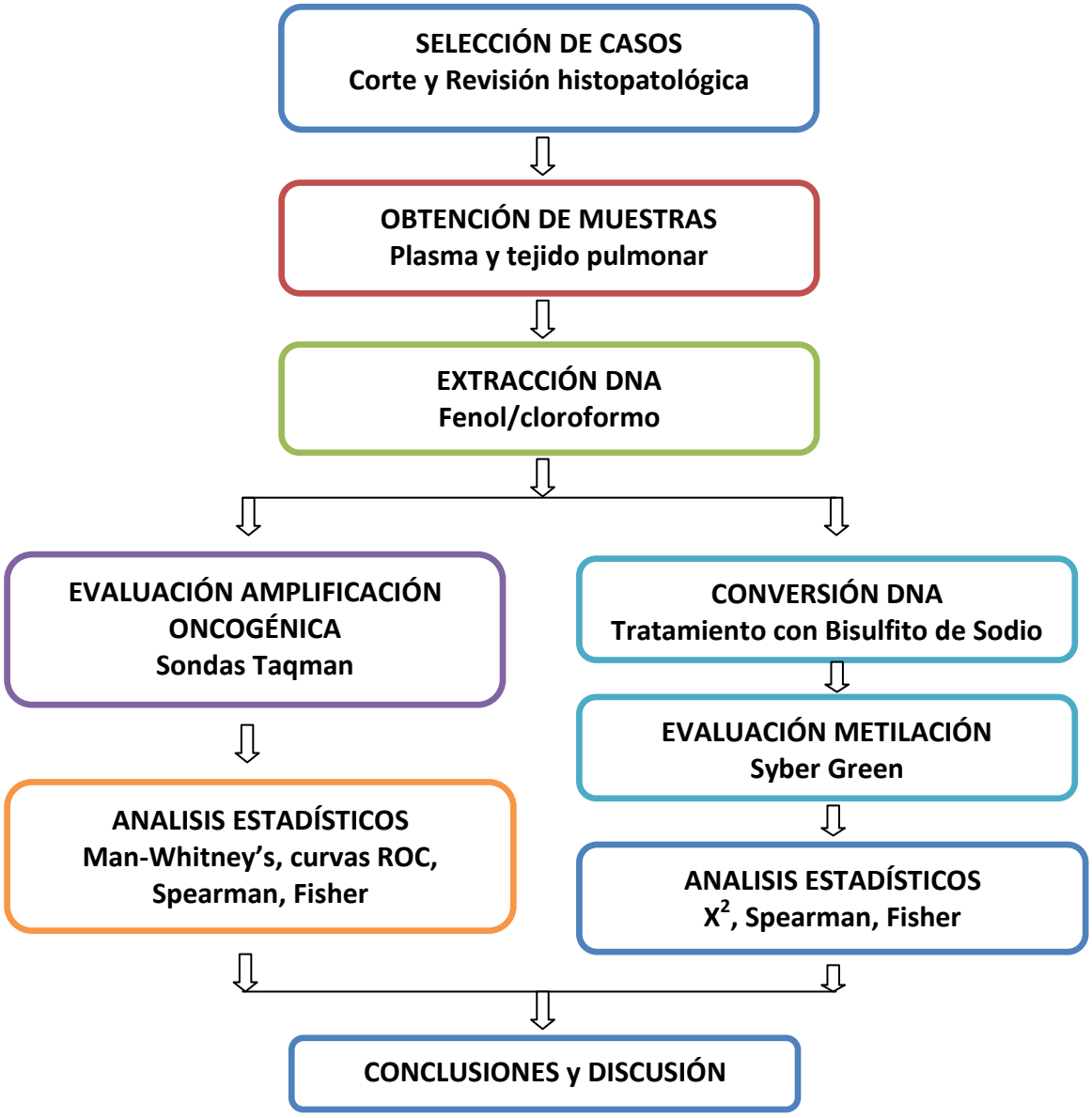


Figura 5. Esquema Metodológico General. Después de quetodos los casos fueron revisados por patología, se separó el plasma sanguíneo por centrifugación, y el tejido pulmonar por microdisección, se extrajo el DNA con el método fenol cloroformo, la evaluación de amplificación oncogénica se realizó directamente sobre este DNA usando sondas Taqman, y la evaluación de metilación se realizó MSP-PCR con SyberGreen después de convertir el DNA con Bisulfito de Sodio.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se recolectaron muestras pareadas de plasma y de tejido pulmonar embebido en parafina de 55 pacientes diagnosticados con cáncer primario de pulmón, atendidos entre los años 2004-2009 en el Hospital Santa Clara, Fundación Santa Fe de Bogotá, Hospital Militar o clínica Saludcoop,. Sin embargo, debido a que algunas de las muestras de tejido embebido en parafina presentaron zonas con necrosis y zonas con abundantes linfocitos o muy poca cantidad de células neoplásicas, estos casos se descartaron del estudio, quedando finalmente con 27 casos que contaban tanto con la muestra de plasma (PC) como con el tejido tumoral (TC) incluido en parafina, los cuales se llamaron "muestras pareadas" y 28 muestra de plasma sin tejido pulmonar. (Tabla 1). Para los estudios de metilación se utilizaron 26 muestras pareadas, debido que el DNA obtenido de bloques de parafina no fue suficiente para evaluar los 12 marcadores propuestos en el estudio.

VARIABLE	PLASMAS	TUMOR
GÉNERO (n, %)		
Masculino	36 (65%)	19 (70%)
Femenino	19 (35%)	8 (30%)
EDAD [a]	60 (25, 85)	58,6 (25, 85)
HISTOLOGÍA DEL TUMOR (n)		
Lesión Preneoplásica	1 (1,8%)	0
Carcinoide	3 (5,4%)	2 (7,4%)
Carcinoma Escamocelular	15 (27%)	9 (33%)
Adenocarcinoma	25 (45%)	11 (40,7%)
Adenoide Quístico	1 (1,8%)	1 (3,7%)
Anaplásico de Célula Pequeña	2 (3,6%)	1 (3,7%)
Anaplásico de Célula Grande	3 (5,4%)	2 (7,4%)
Otros [b]	5 (9%)	1 (3,7%)
CARACTERISTICA DEL TUMOR [c]		
Pobremente Diferenciado	9	6
Medianamente Diferenciado	9	1
Bien Diferenciado	18	15
No especificado	20	6

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con cáncer de pulmón. [a]Promedio (rango), [b]Patrones mixtos, [c] Dos muestras se caracterizan por estar pobre y medianamente diferenciadas.

Como controles del estudio se utilizaron 55 plasmas de voluntarios sanos (PS), no fumadores, del mismo sexo y rango de edad que los pacientes con cáncer, y 35 muestras de tejido pulmonar sano (TS), embebidos en parafina, proporcionados por el departamento de Patología del Hospital Santa Clara.

3.2.1 Criterios de inclusión:

Los criterios que se tuvieron en cuenta para que un paciente entre en este estudio de biomarcadores del cáncer de pulmón, fueron los siguientes:

- Que el paciente haya tenido un diagnóstico confirmado de cáncer primario pulmonar con alguno de los siguientes tipos histológicos: carcinoma escamoso, adenocarcinoma, carcinoma anaplásico de Célula Grande o Carcinoma de Células pequeñas.
- Que el paciente esté de acuerdo con participar en el estudio, y haya firmado el consentimiento informado.
- Que se disponga de la muestra de sangre y tejido embebido en parafina antes de la cirugía, y que no haya recibido tratamientos de quimio o radioterapia, antes de la toma de la muestra.

3.3 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Plasma: Antes de la cirugía y con el previo consentimiento informado de los pacientes (ver anexo I), se tomaron 4 ml de sangre periférica en tubos con EDTA. Se separó el plasma por centrifugación a 358g durante 10 min, y para evitar contaminación con DNA proveniente de linfocitos se realizó una segunda centrifugación a 2739g por 10 min. El plasma obtenido se almacenó a -70ºC antes de la extracción de DNA[(120)].

Tejido pulmonar: de cada paciente se obtuvo el correspondiente bloque de tejido pulmonar neoplásico embebido en parafina. Posteriormente se realizaron 3 cortes histológicos consecutivos que fueron coloreados con H&E: un corte histológico de 3µm de espesor que se utilizó para confirmar el diagnóstico por parte del patólogo, y posteriormente identificar y señalar las áreas a microdisectar (áreas donde más del 90% correspondiera a tejido tumoral, sin necrosis y no contaminadas con linfocitos); y se utilizaron dos cortes de 10 µm de espesor para separar los tejidos por microdisección manual.

3.4 EXTRACCIÓN DE DNA

Tanto el plasma sanguíneo obtenido de cada paciente(200µl) como el tejido microdisectado se incubó a 56ºC durante 16 horas,con 200µl de buffer (50mM tris

HCL pH 8.0, 2mM Acetato de Calcio) y proteinasa K (1ug/µl) (BIOLINE) preparada en el mismo buffer. Terminado el tiempo de incubación, se inactivó la enzima colocandolos tubos que contenían la mezcla en una plancha de calentamiento marca*MajorScience,* programada a 98ºC por 10 minutos, y se realizó la extracción del DNA con el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico con el siguiente protocolo:

- Adicionara la mezcla igual volumen de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar con vortex10seg,y centrifugar10 min a 14.000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un tubo, y adicionar igual volumen de cloroformo, mezclar con vortex 10 seg y centrifugar 10 min a 14.000 rpm.
- Transferira otro tubolafase acuosa, adicionar igual volumen de acetato de sodio 3M pH 5,2 más3 volúmenes de etanol al 100% y 1ul de glicógeno. y dejar precipitando toda la noche a -20ºC.
- Centrifugar10min a 10.000 rpm, descartarelsobrenadante,ylavar el pellet con 100 µl de etanol al 70%.
- Finalmente centrifugar 10min a 10.000 rpm, descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet antes de resuspenderlo en 50 ul de buffer TE. Almacenar a -20ºC.

La calidad del DNA se evaluó con PCR convencional, amplificando una secuencia Alu de 247 pb, con los cebadores y condiciones reportadas por Umetani et al. [121]yrealizando una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño de la banda.

3.5 EVALUACIÓN DE METILACIÓN

3.5.1 Conversión delDNA: Para determinar el estado de metilación de los genes supresores tumorales propuestos, el DNA obtenido tanto de plasma como de bloques de parafina, se sometió a tratamiento con Metabisulfito de Sodio para convertir las citosinas no metiladas a Uracilo, aplicando el protocolo sugerido por Schumacher[122]como se indica a continuación:

- Prepararunmezclacon 2,56M de Metabisulfito de Sodio, 240mM de NaOH, 8mM de Hydroquinona, 1mM de Cloruro de Tetraetilamonio, 300mM de GuanidinaHidroclorhídrica en un volumen final de 10 ml.
- Desnaturalizarel DNA en el termociclador programado a 95ºC durante 3 minutos y colocar inmediatamente en hielo. (La concentración del DNA de las muestras variaba entre 5 y 15 ng/µl y se usó20µl de cada muestra por conversión, el protocolo sirve para convertir hasta 500 ngde DNA)
- A cada DNA desnaturalizado agregar 120µl del mix con Metabisulfitoy colocar en el termociclador con el siguiente programa:

  95ºC x 30 segundos
  58ºC x 20 minutos } 4 ciclos
  95ºC x 10 segundos }
  58ºC x 20 min
  20ºC α

- El DNAfuepurificadocon el kit AxyGen catálogo Nº AP-MN-BF-VNA-250 y seresuspendióen100ul de H_2O estéril tipo HPLC.
- Se realizó desulfonaciónincubando el DNA con NaOH a 0,3M durante 20 minutos a 42ºC. Y se dejó precipitando toda la noche a -20ºC con 25ul de acetato de amonio 5M pH 8, 300ul de etanol al 95%, y 1ul de glicógeno (sigma).
- Al día siguiente, se centrifugó 20 minutos a 12.000g, se descartó el sobrenadante.Seguidamente, el pellet fue lavado con 500µl de etanol al 75%, preenfriado a 4ºC, se centrifugó 10 minutos a 12.000g, se descartó sobrenadante, y finalmente el DNA convertido fue resuspendido en 20 ul de H_20 estéril tipo HPLC.

3.5.2 PCR específica para metilación (MS-PCR): Para evaluar el estado de metilación del promotor de los genes p16, FHIT, APC, TIMP2, MGMT, RASSF1A, se diseñóconel programa Methyl Primer Express® cebadores específicos para detectar la secuencia metilada y otros para la no metilada. (Tabla 2)y se realizó PCR- Tiempo Real, usando Sybr Green (Bioline) como sistema de detección. Cada muestra se procesó por duplicado, en el equipo LightCycler® 480 de Roche, usando el siguiente programa:

Preincubación:	95ºC x 10 minutos.	
Amplificación:	95ºC x 10 segundos Tº de anillamiento x 15 segundos 72ºC x 10 segundos	50 ciclos
Curva de Melting:	5ºC x 5 segundos 65ºC x 1 minuto 97ºC	
Enfriamiento:	40ºC 10 segundos.	

Como control se utilizó en cada placa de PCR un DNA 100% y 0% metilado (EpiTect PCR Control DNA Set. Cat Nº 59695 Roche).Así mismo, como control de conversión, se usaron cebadores *AluC4*, ya que amplifican una secuencia *Alu*, que no se encuentra metilada en personas jóvenes ni adultos mayores y no sufre la inestabilidad genética ni epigenéticapropia de las células tumorales [123](Tabla 2). Por lo tanto como no tiene sitios CpGs metilados, si la conversión es adecuada, siempre debe amplificar esta secuencia.

Después de cada MSP-PCR se comprobó que la curva de amplificación se detectara positiva por el equipo LightCycler® 480 y que la curva de melting correspondiera a la Tm esperada para cada producto, así mismo se corroboró el tamaño del producto en geles de agarosa al 2% (anexo III).

GEN	Secuencia que amplifica	Cebadores	Tºa.	T. prod.
P16	Metilada	**F:** 5´CGTTTTAAGTGGGTGGTTC 3´ **R:** 5´AACGTAAACCGACAAAACCT 3´	55º C	101 pb.
	No metilada	**F** 5´TATTGTTTTAAGTGGGTGGTTT 3´ **R** 5´CAACATAAACCAACAAAACCTTA 3´	53º C	
FHIT	Metilada	**F** 5´AAATTGAGGTACGGGGTTAC 3' **R** 5´CCTATTAAAACGAATTTTCGC 3´	55º C	134 pb.
	No metilada	**F:** 5´GGAAATTGAGGTATGGGGTTAT 3' **R:** 5' ACCTATTAAAACAAATTTTCACTACT3'	58º C	
APC	Metilada	**F:** 5´CGGTAGGAGACGAAGAGTTC 3´ **R:** 5´GAACCGAACACCGTAAAATC 3´	55º C	154 pb.
	No metilada	**F:**5´GTTTGGTAGGAGATGAAGAGTTT 3´ **R:** 5´AAACCAAACACCATAAAATCCCA 3´	56º C	
TIMP2	Metilada	**F** 5´GTCGGGTATAATAAAAGCGC 3´ **R** 5´CCGAACCGCAATTTTATTA 3´	60º C	147 pb.
	No metilada	**F:** 5´ TAGGTTGGGTATAATAAAAGTGTGG 3´ **R:** 5´ AACCAAACCACAATTTTATTACACTC 3´	60º C	
MGMT	Metilada	**F:** 5´GCGCGTTTTTAGGATTATTC 3´ **R:** 5´GAATAACCCTTCGACCGATA 3´	55º C	162 pb.
	No metilada	**F:** 5´ GTGTGTTTTTAGGATTATTTGGGT 3´ **R:** 5´ AAATAACCCTTCAACCAATACAAAC 3´	54º C	
RASSF1A	Metilada	**F** 5´ AGAAATACGGGTATTTTCGC 3´ **R** 5´ CGAAACTAAACGCGCTCT 3´	60º C	135 pb.
	No metilada	**F:**5´ TAGAAATATGGGTATTTTTGTGTGG 3´ **R:**5´ AAACAAAACTAAACACACTCTCAC 3´	58º C	
AluC4	No metilada	**F:** 5´GGTTAGGTATAGTGGTTT 3´ **R:** 5´ATTAACTAAACTAATCTTA 3´	60º C	98pb

Tabla 2. Cebadores usados para evaluar metilación. F: Forward, R: Reverse. Las reacciones se hicieron en un volumen final de 10µl, contenían1X de masterSybr Green, 2 µM de cada cebador, y 3 µl de DNA.

3.6 EVALUACIÓN DE AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA

El número de copias génicas se evaluó en cada muestra por PCR múltiplex en tiempo real utilizando sondas TaqMan. Para esto, se confirmó que las eficiencias de las amplificaciones para cada genfueran similares, usando el método publicado por Livak K y cols.[(124)].
Se realizaron dos mezclas de PCR, una para los genes EGFR, ERBB2, AKT2 y ACTB y otra para MYC, MYCN, MYCL1 y ACTB.

Se determinó la dosis génica de cada oncogén respecto al gen de referencia ACTB, utilizando el método de cuantificación relativa doble delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$), en ensayos por duplicado, usando el kit TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, en el equipo AppliedBiosystem 7.500. Los cálculos se hicieron siguiendo las instrucciones de este equipo [(125)]. En resumen, se utilizaron los valores de C_T, es decir, el número del ciclo en el cual la intensidad de la fluorescencia se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR y se aplicaron las siguientes fórmulas:

- ΔC_T = CT del gen blanco – CT del gen referencia
- $\Delta\Delta C_T$ = ΔCT muestra blanco – ΔCT muestra control.

Las reacciones se hicieron en un volumen final de 25 µl, contenían: 1x de Master mix, 0,04µM de cada cebador y 0,375µM de cada sonda. El programa de PCR usado fue: 95ºC x 10 min, 50 ciclos (95ºC x 15 seg, 61ºC x 1 min). En la tabla 3 se muestra la secuencia de los cebadores y sondas usados. Un valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ mayor a 2 se consideró amplificación génica[(126)].

GEN	SONDA (5'-3´)	CEBADOR DERECHO(5'-3´)	CEBADOR IZQUIERDO (5'-3´)
ERBB2	(tamrra) ATCCGTCCGCCTCAGCCTCCCAAA (Hex)	GTCTTGAACTCCCCACCTCAG	ACAGACGGTACACACTTTTAAAGG
EGFR	(Fam) AACTAACCGCCGCCAGCACCACC (tamrra)	GACCTGGGAGCTGGGAGAAC	ACCTGCCTTTTGCCAACGAG
AKT2	(tamrra) ACCACGAGCCACGGAAGCCAGTCA (rox)	AGACCTGGGCTGGTGATGTG	CAGACTGTGGGACCTTTCTCTC
MYC	(tamrra) ACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGA (rox)	TCTACTGCGACGAGGAGGAG	GCAGCAGCTCGAATTTCTTCC
MYCN	(tamrra) CGCCGCTTCTCCACAGTGACCACG (hex)	AGGAAGATGAAGAGGAAGAAATCG	TGACAGCCTTGGTGTTGGAG
MYCL1	(tamrra) ACCTGGAGACACCTGGACACGCCC (tamrra)	CCTAAGAGACCTTCAAGCCAGTG	CCAGATATGGGGCTCATAACACC
B-ACTINA	(tamrra) TTGCCTCCCGCCCGCTCCCG (fam)	CCGTCTTCCCCTCCATCGTG	GGCTCCTGTGCAGAGAAAGC

Tabla 3.Secuencia de Cebadores y sondas Taqman usados para evaluar amplificación oncogénica. Al lado izquierdo de cada sonda se menciona el fluorocromo usado como "*quencher*" y al lado derecho el reportero.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis datos de metilación:

Con el complemento de Excel XLSTAT se realizó el test Chi cuadrado X^2 para determinar si existen diferencias en el estado de metilación entre muestras sanas y con cáncer tanto de plasma como de tejido pulmonar. SeevaluóelOdds Ratio (OD), sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV) de cada marcador de metilación para discriminar fenotipo normal de tumoral.

Para estimar si el estado de metilación observado en tumor es detectable en plasma del mismo paciente, se realizó la prueba de Spearman determinando el coeficiente de correlación de las muestras pareadas de plasma y tejido neoplásico,

Adicionalmente se determinó si los marcadores de metilación se asocian a alguna de las características clínicas de los pacientes mediante un test de Fisher.

Análisis datos de Amplificación:

En el programa MedCalc, se realizó el test Man-Whitney's para determinar diferencias en el número de copias génicas entre muestras neoplásicas y sanas, tanto para DNA obtenido de plasma como de bloques de parafina. Adicionalmente se realizaron diagramas de cajas y bigotes "Box and Whisker".

Con el complemento de Excel XLSTAT, se evaluó el potencial de cada marcador para discriminar entre fenotipo tumoral y normal realizando curvas ROC.

Para estimar si la amplificación oncogénica del tumor es detectable en plasma, se realizó la prueba de Spearman determinando el coeficiente de correlación de las muestras pareadas de plasma y tejido neoplásico y se estimó sensibilidad, especificidad, PPV, y NPV de cada oncogén.

Se determinó si cada marcador de amplificación está asociado a alguna característica clínica de los pacientes mediante un test de Fisher.

4. RESULTADOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN.

En la tabla 1 se resumen las características de la población incluida en el estudio con diagnóstico confirmado de cáncer pulmonar, la población estuvo conformada por un grupo de 55 pacientes, 36 hombres (65%) y 19 mujeres (35%), con un promedio de edad de 60 años (rango 25-85), 1 de ellos presentó lesión preneoplásica, 3 tumor carcinoide, 15 carcinoma escamocelular, 25 adenocarcinoma, 1 tumor adenoide quístico, 2 tumor anaplásico de célula pequeña, 3 anaplásico de célula grande, y 5 presentaron patrones mixtos.

En la tabla 4 se resumen las características de los voluntarios sanos, quienes donaron su muestra de sangre para obtención de los controles de plasma, y respondieron una encuesta (Anexo II), la cual permitió confirmar que estas personas tuvieran la misma edad y sexo de los pacientes con cáncer, que no hubieran sufrido ningún tipo de neoplasia, y que no fueran fumadores en la actualidad.

CARACTERISTICAS DE CONTROLES PLASMAS	
VARIABLE	
***GÉNERO (%)*[a]**	
Masculino	36 (65%)
Femenino	19 (35%)
EDAD	60 (25, 85)[b]
***HÁBITO DE FUMAR (%)*[c]**	
fumadores	0
exfumadores	17 (31%)
no fumadores	38 (79%)
ANTECEDENTES FAMILIARES[c]	
Sin cáncer	31 (56%)
con cáncer 1º	15 (27%)
con cáncer 2º	4 (7%)
con cáncer 3º	5 (9%)
REGIÓN DE COLOMBIA	
Andina	53 (96%)
Pacífica	1 (2%)
Caribe	1 (2%)

Tabla 4. Características de voluntarios sanos. Como controles sanos se escogieron personas de la misma edad y sexo de los pacientes con cáncer. [a] número (porcentaje), [b] promedio (rango) [c] todos los exfumadores manifestaron haber dejado de fumar mínimo hace diez años, [d]antecedentes de cáncer en familiares en primer (1º), segundo (2º) y tercer (3º) grado de consanguinidad.

Respecto a los controles de tejido pulmonar, se incluyeron 35 muestras de tejido sano(TS) embebido en parafina, proporcionados por el departamento de Patología del Hospital Santa Clara. Estas muestras provenían de autopsias realizadas en esta institución entre los años 1999 al 2009.Se hizo una revisión de las historias clínicas y se seleccionaron muestras donde la causa de muerte no fuera cáncer. Adicionalmente todas las muestras se revisaron por patología para confirmar el diagnóstico normal. En la tabla 5 se resumen las características clínicas de éstos controles.

VARIABLE	N (%)
GÉNERO (%)[a]	
Masculino	21 (60%)
Femenino	14 (40%)
EDAD [b]	35 (0.5, 78)
CAUSA DE MUERTE	
Edema cerebral	3
Cirrosis	1
Muerte súbita	2
Insuficiencia cardiaca congestiva	2
Encefalitis	3
Hemorragia cerebral	3
Síndrome cerebeloso	2
Meningoencefalitis	3
Meningitis	7
Neumonía	3
Trauma craneoencefálico	6

Tabla 5. Características de controles tejido pulmonar. Se escogieron casos de autopsias donde el tejido pulmonar se encontraba normalsegún la revisión histopatológica y no existiera antecedentes de cáncer en la historia clínica.[a] número (porcentaje), [b] promedio (rango).

4.2 METILACIÓN DE PROMOTORES GÉNICOS

4.2.1 METILACIÓN EN PLASMA

Al evaluar la metilación de los genes supresores tumoralesenel DNA libre en plasma de los pacientes con cáncerpulmonar,se observó que las frecuencias de metilación para los 6 genes evaluados fueron: para MGMT (42%) de las muestras, seguidos de P16 (38%), de APC (33%), RASSF1 (16%), TIMP2 (16%), y finalmente FHIT (15%).

Aunque, en DNA libre en plasma de voluntarios sanos las frecuencias de metilación encontradas tienden a ser más bajas: p16 (35%), MGMT (33%), APC (24%), TIMP2 (22%), FHIT (9%), y RASSF1 (2%), el análisis de Chi cuadrado X^2, revela diferencias significativas entre plasma proveniente de voluntarios sanos y pacientes con cáncer solo para el gen RASSF1 (p=0,02) como se observa en la figura 6, anexo 5 y 6.

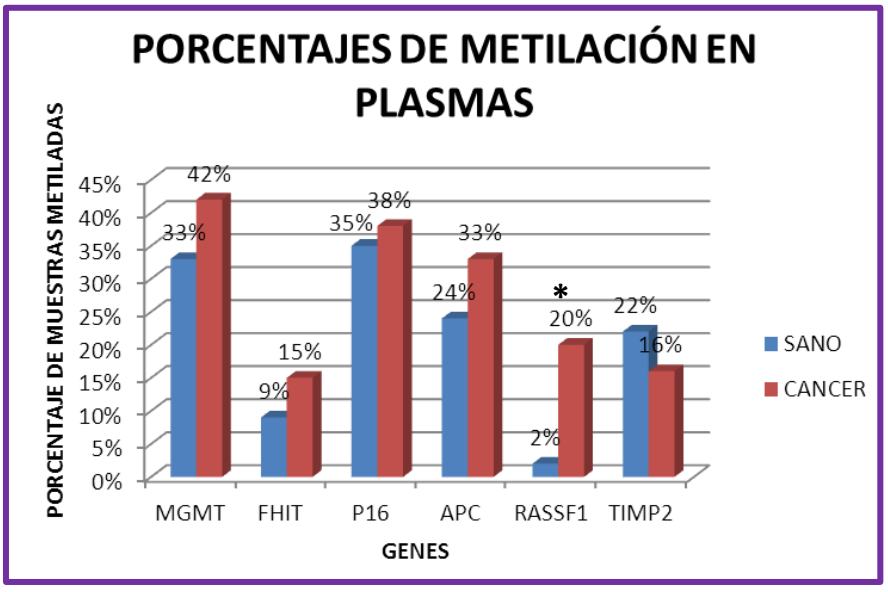


Figura 6. Porcentajes de metilación de los genes supresores tumorales en plasma sanguíneo. Las barras rojas representan el porcentaje de plasmas proveniente de pacientes con cáncer que exhiben metilación de cada gen y las barras en azul plasma proveniente de voluntarios sanos. * X^2 p=0.02.

4.2.2 METILACIÓN EN TEJIDO PULMONAR

Los genes metilados con mayor frecuencia en los tumores primarios fueron P16 y MGMT (en el 42% de las muestras), seguidos de RASSF1A (31%), APC, FHIT (27%), y finalmente TIMP2 (26%).
En pulmón sano, se presentan frecuencias de metilación más bajas para los seis genes, pero las diferencias son estadísticamente significativas solo para los genes: p16 (p=0,014), y RASSF1 (p=0,002), como se observa en la figura 7 y anexo 7 y 8.

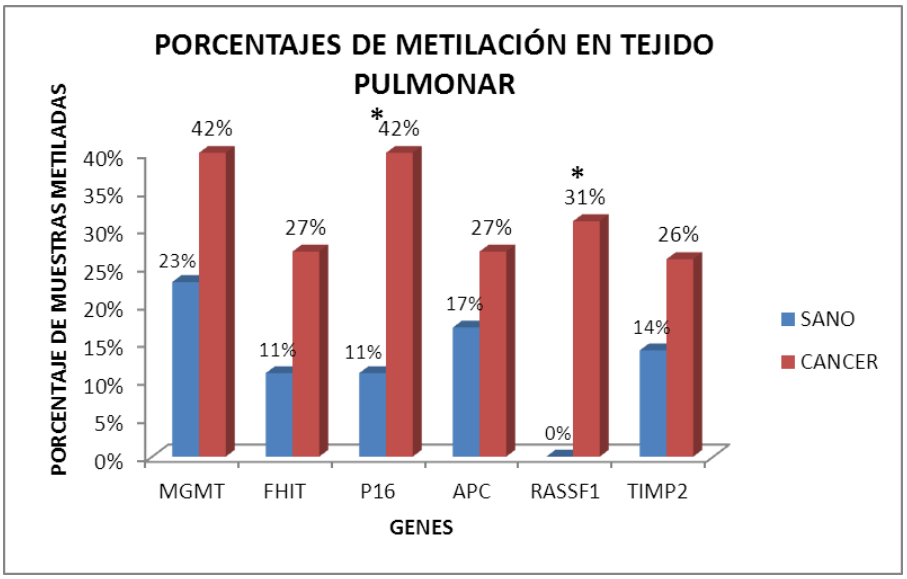


Figura 7. Porcentajes de metilaciónde los genes supresores tumorales en tejido pulmonar. Las barras rojas indican el porcentaje de tumores que presentan metilación de cada gen y las barras en azul el porcentaje de muestras de pulmón sanometiladas.* Existen diferencias significativas para los genes p16 (p=0.014) y RASSF1A (p=0.002).

En los análisis hechos hasta el momento para los resultados de metilación, se han tenido en cuenta dos variables: si está o no metilado el gen supresor tumoral.
Sin embargo en los resultados se observaron muestras que presentaban tanto alelos metilados como no metilados (tabla 6) (anexo 5) (anexo 6). Por lo que se clasificaron las muestras en tres grupos:

- Muestras que presentan solo el alelo metilado,
- Muestras que presentan tanto el alelo metilado como no metilado,
- Muestras que presentan solo el alelo no metilado.

Y se realizó un Chi cuadrado, que revela diferencias significativas no solo para el gen RASSF1, sino también para los genes APC, y TIMP2 en plasma sanguíneo y

para P16 y TIMP2 en tejido pulmonar (tabla 6). Señalando la importancia de evaluar cada secuencia génica con cebadores que amplifiquen no solo la secuencia metilada sino también la no metilada.

GENES		PC	PS	TC	TS
MGMT	M	21 (38 %)	16 (29%)	7 (27%)	6 (17%)
	M Y N	1 (2%)	2 (4%)	4 (15%)	2 (6%)
	N	33 (60%)	37 (67%)	15 (58%)	27 (77%)
Valores P (X^2)		0,541		0,239	
FHIT	M	7 (13%)	4 (7%)	5 (19%)	1 (3%)
	M Y N	1 (2%)	1 (2%)	2 (8%)	3 (9%)
	N	47 (89%)	50 (91%)	19 (73%)	31 (89%)
Valores P (X^2)		0,636		0,108	
P16	M	18 (33%)	13 (24%)	9 (35%)	2 (6%)
	M Y N	3 (5%)	6 (11%)	2 (8%)	2 (6%)
	N	34 (62%)	36 (65%)	15 (58%)	31 (89%)
Valores P (X^2)		0,397		0,012	
APC	M	15 (27%)	3 (5%)	4 (15%)	5 (14%)
	M Y N	3 (5%)	10 (18%)	3 (12%)	1 (3%)
	N	37 (67%)	42 (76%)	19 (73%)	29 (83%)
Valores P (X^2)		0,002		0,391	
RASSF1	M	7 (13%)	0 (0%)	7 (27%)	0 (0%)
	M Y N	4 (7%)	1 (2%)	1 (4%)	0 (0%)
	N	44 (80%)	54 (98%)	18 (69%)	35 (100%)
Valores P (X^2)		0,007		0,001	
TIMP2	M	7 (13%)	2 (4%)	7 (27%)	0 (0%)
	M Y N	2 (4%)	10 (18%	0 (0%)	5 (14%)
	N	46 (84%)	43 (78%)	19(73%)	30 (86%)
Valores P (X^2)		0,017		0,001	

Tabla 6.Detección de marcadores de metilación. La tabla muestra la cantidad y porcentaje correspondiente, de muestras a las cuales se les encontraron solo alelos metilados (M), alelos metilados y no metilados (M, N) o solo alelos no metilados (N); en plasma de pacientes con cáncer (PC), plasma de voluntarios sanos (PS), en muestras de tumor(TC) y tejido pulmonar sano (TS).

4.2.3 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, PPV. NPV Y OR.

Al evaluar la sensibilidad, especificidad, PPV, NPV de los 6 marcadores de metilación para diferenciar los fenotipos sano y con cáncer, se observó que todos tienen valores de sensibilidad por debajo de 43, es decir la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo no sobrepasa el 43% en ningún caso, lo que indica que estos marcadores no son eficientes para el diagnóstico del cáncer de pulmón en población colombiana. Sin embargo el gen RASSF1, alcanzó un valor de especificidad de 98 en plasma y 100 en pulmón, es decir, este marcador tiene una probabilidad entreel98% y 100% de clasificar correctamente un individuo sano si se analiza plasma y tejido pulmonar respectivamente. Lo que genera un OR de 33, indicando que si RASSF1A se detecta metilado en el tejido pulmonar, hay 33 veces más probabilidad de que este tejido sea tumoral frente a uno que no tenga metilado este gen. Si el análisis se realiza a partir de plasma sanguíneo el ORes igual a 9.(Tabla 7 y 8).

GEN	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	PPV	NPV	OR
MGMT	42 (28 - 56)	67 (54 - 81)	56 (37 - 73)	54 (41 - 66)	1 (0,6 – 3)
FHIT	15 (4 - 25)	91 (83 - 99)	52 (41 - 62)	50 (40 - 60)	2 (0,5 – 5)
P16	38 (24 - 52)	64 (50 - 77)	51 (35 - 68)	51 (38 - 63)	1 (0,5 – 2)
APC	33 (19 - 46)	75 (62 - 87)	56 (38 - 75)	53 (38 - 75)	1 (0,6 – 3)
RASSF1A	20 (9 - 31)	98 (94 - 100)	92 (72 - 100)	55 (45 - 65)	9 (2 – 54)
TIMP2	16 (6 - 27)	78 (66 - 90)	49 (19 - 66)	48 (37 - 59)	0,7 (0,3 – 2)

Tabla 7. Valores de sensibilidad, especificidad, PPV, CPV y OR de los marcadores de metilación en plasma sanguíneo.PPV: Valor predictivo positivo, CPV: valor predictivo negativo, OR: Odds Ratio

GEN	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	PPV	NPV	OR
MGMT	43 (21 - 63)	77 (62 - 92)	57 (33 - 83)	64 (49 - 80)	2 (1, 7)
FHIT	27 (8 - 50)	89 (77 - 100)	64 (31 - 97)	62 (48 - 76)	3 (1 , 10)
P16	42 (21 - 63)	89 (77 - 100)	73 (48 - 99)	67 (53 - 82)	5 (1 – 18)
APC	27 (8 - 46)	83 (69 - 97)	54 (23 - 85)	60 (46 - 75)	2 (0,5 – 6)
RASSF1A	31 (11 - 50)	100 (99 - 100)	100 (94 -100)	66 (52 - 80)	33 (2 -597)
TIMP2	27 (8 - 46)	86 (73 - 99)	58 (26 - 90)	61 (47 - 76)	2 (1 -7)

Tabla 8. Valores de sensibilidad, especificidad, PPV, CPV y OR de los marcadores de metilación en tejido pulmonar.PPV: Valor predictivo positivo, CPV: valor predictivo negativo, OR: Odds Ratio

4.2.4 CORRELACIÓN MUESTRAS PAREADAS

Utilizando una prueba de Spearman(rho) se evaluó si el estado de metilación del tumor es detectable en DNA libre en plasma sanguíneo. Para este objetivo se utilizaron los 26casos en los que se logró obtener DNA tanto de plasma como de tejido tumoral, los cuales llamamos “muestras pareadas”.

El coeficiente de correlación de Spearman toma valores del -1 al 1, indicándonos correlación negativa y positiva respectivamente. Un valor de 0 indica que no hay correlación. Los genes que presentaron mayor correlación respecto al estado de metilación entre tumor y plasma fueron: APC: con un valor de Rho= 0.834 y RASSF1 con Rho= 0.723 (Tabla 9.3)

Articulando este resultado con las observaciones anteriores se concluye que el gen RASSF1 no solo es, de los 6 genes evaluados para metilación, el que genera un OR mayor, sino quesu estado de metilación en plasma está altamente correlacionado con el del pulmón (Rho= 0.723) por lo que podría ser de utilidad en tamizajes a población en riesgo de padecer cáncer pulmonar.

Respecto al gen APC, aunque su estado de metilación en plasma se correlaciona con el encontrado en el tumor (Rho= 0.834), en los análisis anteriores se pudo ver que este gen tiene una sensibilidad muy baja para discriminar DNA proveniente de personas enfermas o sanas, por lo que no es de utilidad en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

En la tabla 9 se indica el estado de metilación de los 6 genes, en las 26 muestras pareadas plasma- tumor y los valores correspondientes de rho y significancia estadística.

MUESTRAS PAREADAS TUMOR - PLASMA												
MGMT		FHIT		P16		APC		RASSF1		TIMP2	
TC	PC	TC	PC	TC	PC	TC	PC	TC	PC	TC	PC
M	M	M	N	M	M	N	N	N	N	M	M
N	N	N	M	M	N	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	N	M	M	M	M	N	N
N	N	N	N	N	N	N	N	M	M	M	N
M	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N	M	N	N	M	N	M	M	M	N	N	N
M	M	M	M	N	N	M	M	M	M	N	N
M	M	N	N	M	N	N	N	N	M	N	N
M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	M
N	N	N	N	N	N	N	M	N	N	N	N
N	M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
M	M	M	N	M	M	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	M	M	M	N	N	N	N
N	M	M	M	M	M	N	N	N	N	N	N
M	M	N	N	N	N	N	N	M	M	N	N
N	M	N	N	N	M	N	N	N	N	N	M
M	M	M	N	N	M	N	N	N	N	M	M
N	M	M	N	M	M	N	M	M	M	N	N
N	N	N	N	N	N	M	M	N	N	M	N
N	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N	N
M	M	N	N	N	M	M	M	N	N	M	M
M	M	N	M	M	M	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	M	M	N	N	M	N	N	N
N	N	N	N	N	M	M	M	M	M	N	N
N	M	M	N	M	M	N	N	N	N	M	M
M	M	N	N	N	M	N	N	N	N	N	N
rho	0.459		0.222		0.324		0.834		0.723		0.697	
p	0.019		0.274		0.106		<0.0001		<0.0001		0.0001	

Tabla 9. Correlación del estado de metilación en muestras pareadas plasma-tumor. Las celdas con M y color gris indican metilación y las celdas blancas con N indican no metilado. TC: Tejido pulmonar con Cáncer, PC: Plasma proveniente de pacientes con cáncer.

4.3 AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA

4.3.1 VALIDACIÓN DEL ENSAYO

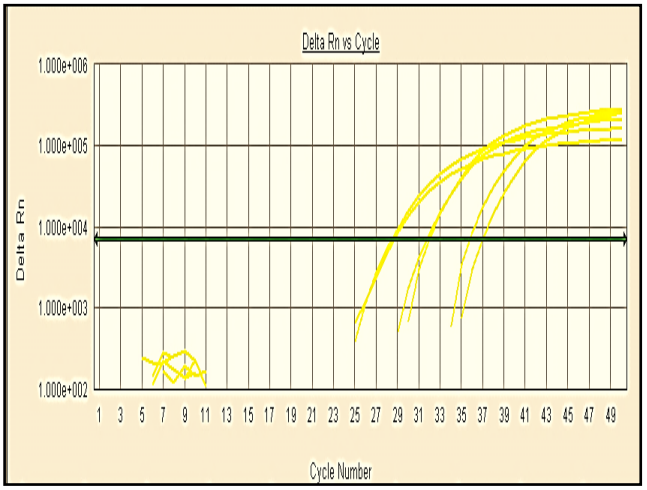
Para que el cálculo de ΔΔCT sea válido, las eficiencias de amplificación del gen normalizador respecto a los genes problema deben ser iguales[127].

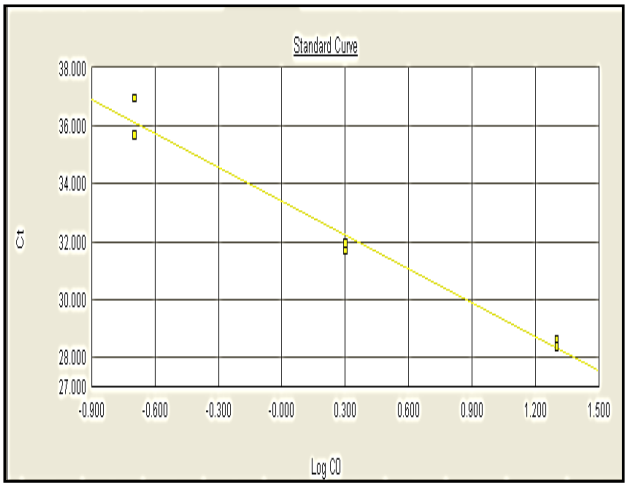
Se evaluó si las eficiencias de amplificación de los genes analizados en este proyecto son similares a la del gen normalizador, usando el método publicado por Livak y Schmittgen[124]Éste método consiste en evaluar como varía el ΔCT (CTblanco– CT normalizador) en una serie de diluciones de DNA molde, los valores de ΔCTobtenidos en las diferentes diluciones son graficados contra los valores, en escala logarítmica, de la concentración de DNA correspondiente a cada dilución para crear una regresión lineal semilogarítmica. La pendiente resultante de la regresión se usa como un criterio para validar el experimento. Si la pendiente es < 0,1 se considera que las eficiencias de lasreacciones son similares.

Se amplificó por duplicado, un DNA blanco, diluido en serie, con concentraciones de 20, 2 y 0,2 ng/µl, usando primers específicos y sondas fluorogénicas para β-actina como gen normalizador y para EGFR, ERBB2, AKT2, MYC, MYCL, MYCN, como genes blanco o problema. En la figura 8 se muestra los resultados de amplificación para el gen normalizador (β-actina) y los respectivos valores de C_T de cada concentración. El Promedio de los $C_T$se usó para calcular el ΔCT delos genes problema.

Las figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 semuestran las curvas de amplificación para los genes EGFR, ERBB2, AKT2, MYC, MYCL, MYCN y la validación del métodoΔΔCT para cada gen.

La validación del ensayo se realizó tanto en mezclas de PCR por separado, como en PCR múltiplex, obteniendo de las dos formas eficiencias de amplificación similares para los genes blanco, respecto al gen de referencia. (Anexo 4)



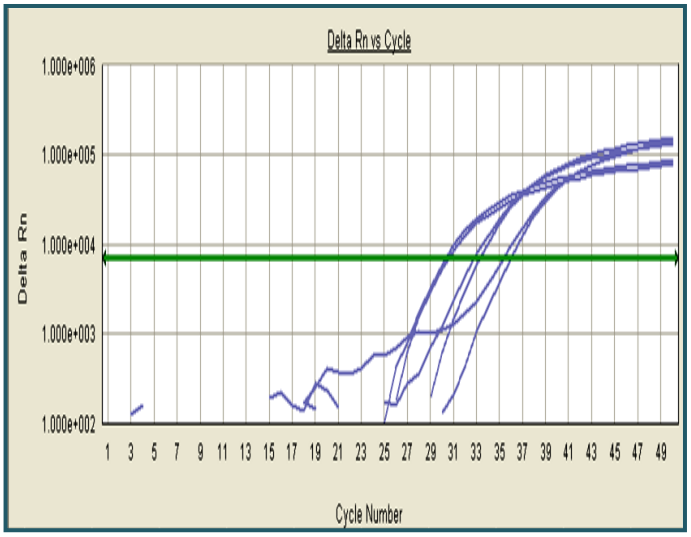


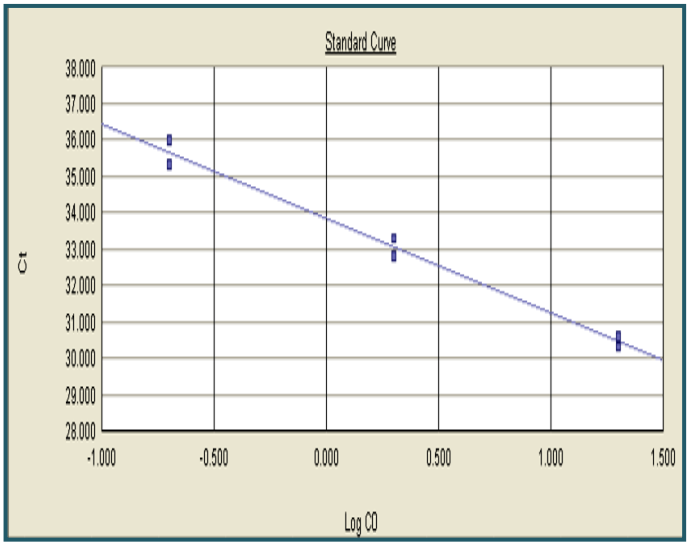
[ng/µl]	Valor de C_T por duplicado β-ACTINA	Valor de C_T promedio β-ACTINA
20	28,6126	28,5092
20	28,4058	
2	31,9498	31,8186
2	31,6874	
0,2	35,6689	36,3130
0,2	36,9571	

Detector:	FAM
Slope:	-3.9019
Intercepto:	33,3881
R2:	0,978

Figura 8. Curva estándar del gen normalizador β-actina. A la izquierda: Curvas de amplificación de β-ACTINA y sus respectivos valores de CT, para las concentraciones de DNA 20, 2 y 0,2 ng/µl. A la derecha: Curva estándar obtenida con los valores de CT para β-ACTINA.

Curva estándar EGFR





[ng/µl]	Valor de ct por duplicado para ERBB2	Valor de ct promedio ERBB2
20	30,5941	30,4560
20	30,3179	
2	32,8248	33,0616
2	33,2983	
0,2	35,3083	
0,2	35,9912	35,6498

Detector:	TAMRA
Slope:	-2,596870
Intercepto:	33,837517
R2:	0,985981

Figura 9. **Curva de amplificación para EGFR**. Arriba: Curvas de amplificación de EGFR y sus respectivos valores de CT, para las concentraciones de DNA 20, 2 y 0,2 ng/µl. Abajo: Curva estándar obtenida con los valores de CT para EGFREGFR

VALIDACIÓN DE ΔΔCT PARA EGFR

Los valores de CT promedio de β-ACTINA y EGFR se usaron para hallar el ΔCT (tabla 10) y realizar la validación del método para EGFR.

Concentración de DNA [ng/µl]	Valor de CT promedio β-ACTINA	Valor de CTpromedio EGFR	ΔCT (CT EGFR – CT β-ACTINA)
20	28,5092	30,4560	1,9468
2	31,8186	33,0616	1,2430
0,2	36,3130	35,6498	-0,6633

Tabla 10:*obtención de valores ΔCT del gen EGFR respecto a β-ACTINA*

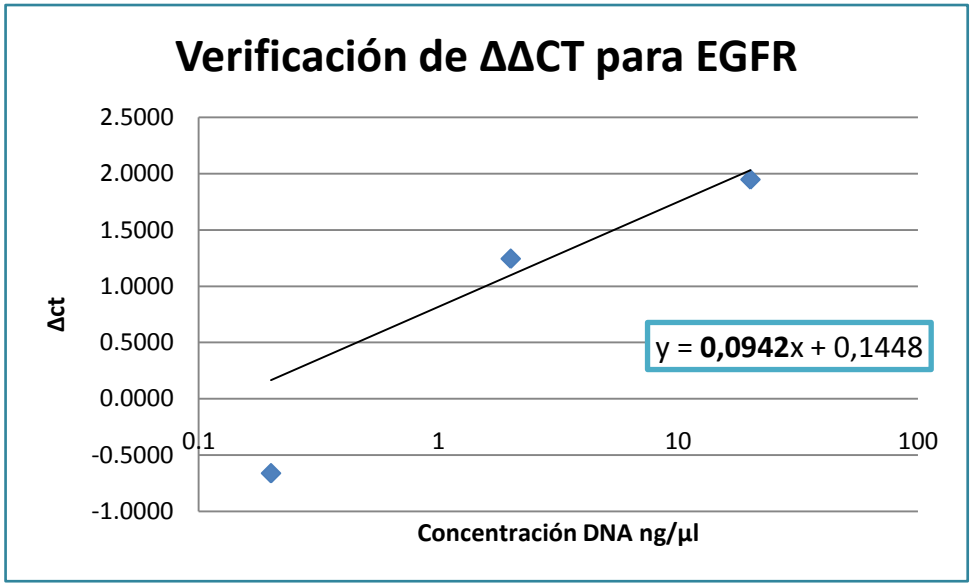
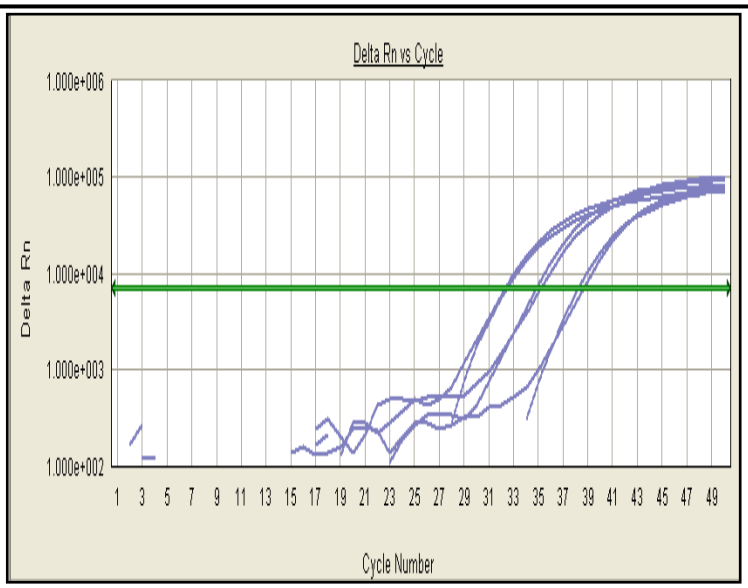
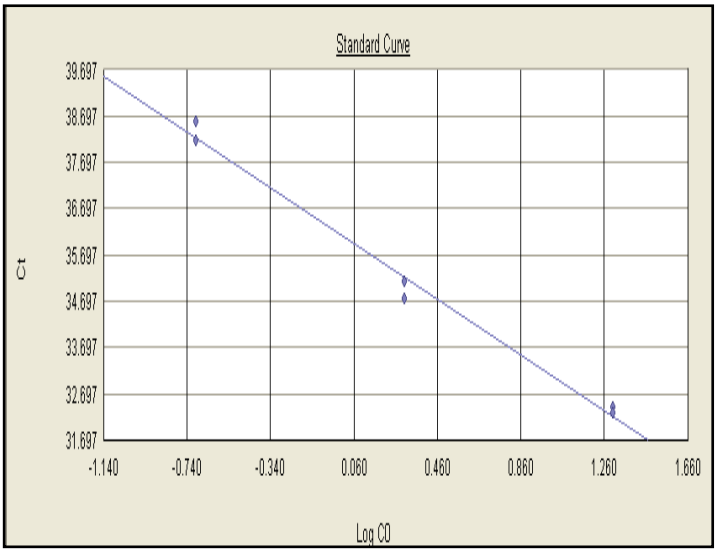


Figura 10. Validación de ΔΔCT para EGFR. Se muestra la relación Concentración DNA contra ΔCT, y se observa una pendiente menor a < 0,1.

Curva estándar ERBB2



[ng/µl]	Valor de C_T por duplicado para ERBB2	Valor de C_T promedio ERBB2
20	32,4151	32,3583
20	32,3015	
2	34,7631	34,9504
2	35,1377	
0,2	38,5799	38,3850
0,2	38,1900	



Detector:	HEX
Slope:	-3.01334
Intercepto:	36,1383
R2:	0,9893

Figura 11. **Curva estándar de ERBB2** Arriba: Curvas de amplificación de ERBB2 y sus respectivos valores de CT, para las concentraciones de DNA 20, 2 y 0,2 ng/µl. Abajo: Curva estándar obtenida con los valores de CT para el gen ERBB2.

VALIDACIÓN DE ΔΔCT PARA ERBB2

Los valores de CT promedio de β-ACTINA y ERBB2 se usaron para hallar el ΔCT (tabla 11) y realizar la validación del método para ERBB2.

Concentración de DNA [ng/µl]	Valor de CT promedio β-ACTINA	Valor de CTpromedio ERBB2	ΔCT (CT ERBB2 – CT β-ACTINA)
20	28,5092	32,3583	3,8491
2	31,8186	34,9504	3,1318
0,2	36,3130	38,3850	2,07195

Tabla 11:*obtención de valores ΔCT del gen ERBB2 respecto a β-ACTINA*

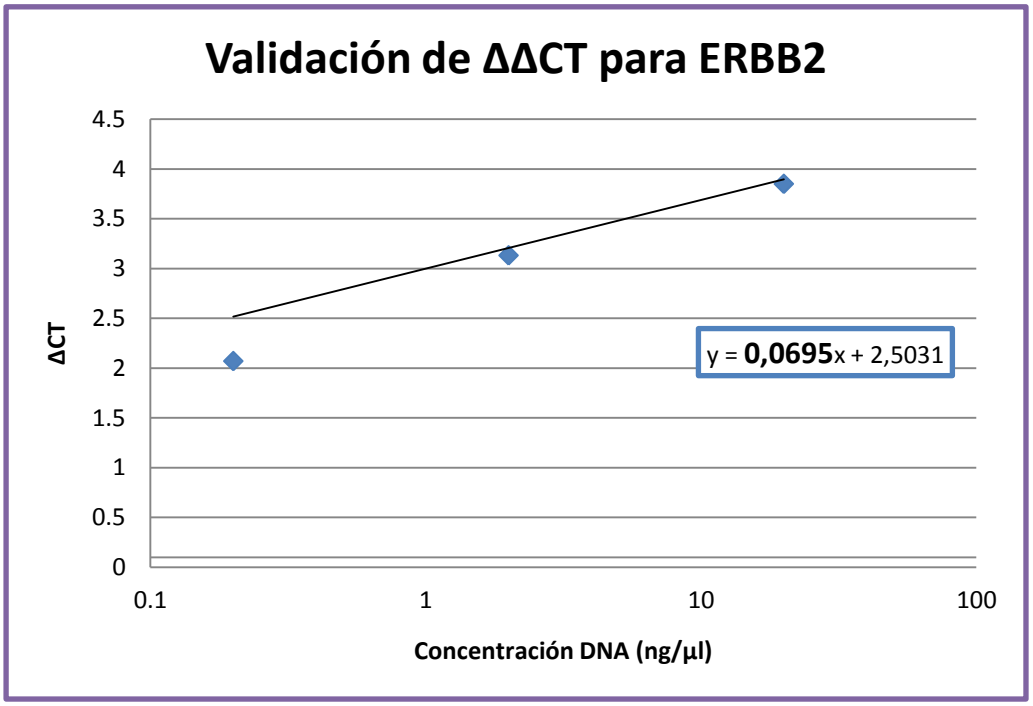
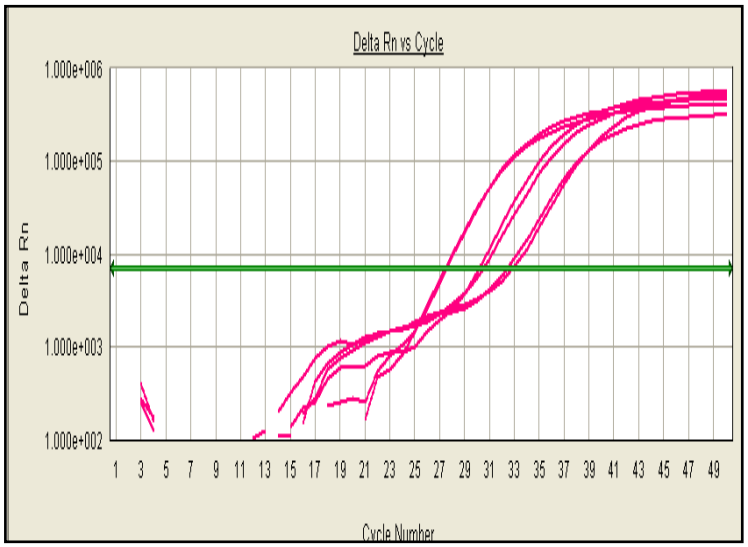
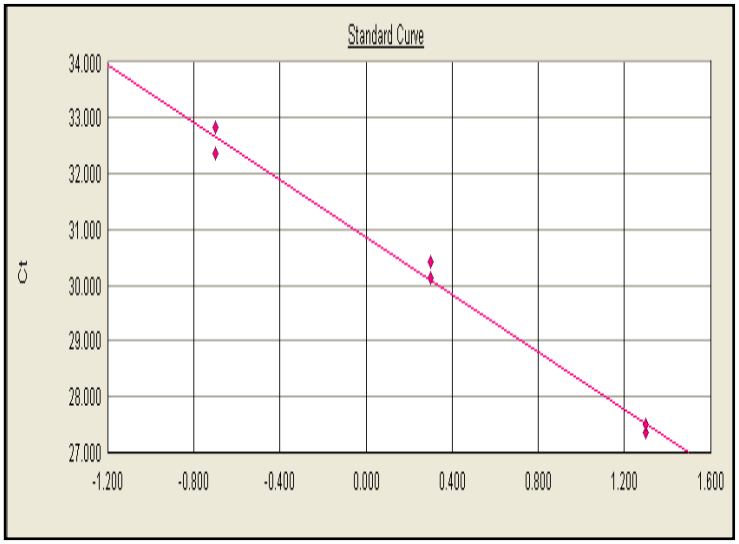


Figura 12. **Validación de ΔΔCT para ERBB2**. Se muestra la relación Concentración DNA contra ΔCT, y se observa una pendiente menor a < 0,1.

CURVA ESTÁNDAR DE AKT2



[ng/µl]	Valor de ct por duplicado para AKT2	Valor de ct promedio para AKT2
20	27,3715	27,4349
20	27,4983	
2	30,4063	30,2603
2	30,1143	
0,2	32,3595	32,5860
0,2	32,8125	



Detector:	ROX
Slope:	-2.575560
Intercepto:	30.869062
R2:	0.91166

Figura 13. **Curva estándar de AKT2.** Arriba: Curvas de amplificación de AKT2 y sus respectivos valores de CT, para las concentraciones de DNA 20, 2 y 0,2 ng/µl. Abajo: Curva estándar obtenida con los valores de CT para el gen AKT2

Los valores de CT promedio de β-ACTINA y AKT2se usaron para hallar el ΔCT (tabla 12) y realizar la validación del método para AKT2. (Figura 12)

Concentración de DNA [ng/µl]	Valor de CT promedio β-ACTINA	Valor de CT promedio AKT2	ΔCT (CT ERBB2 – CT β-ACTINA)
20	28,5092	27,4349	-1,0743
2	31,8186	30,2603	-1,5583
0,2	36,3130	32,5860	-3,7270

Tabla 12: *obtención de valores ΔCT del gen AKT2 respecto a β-ACTINA*

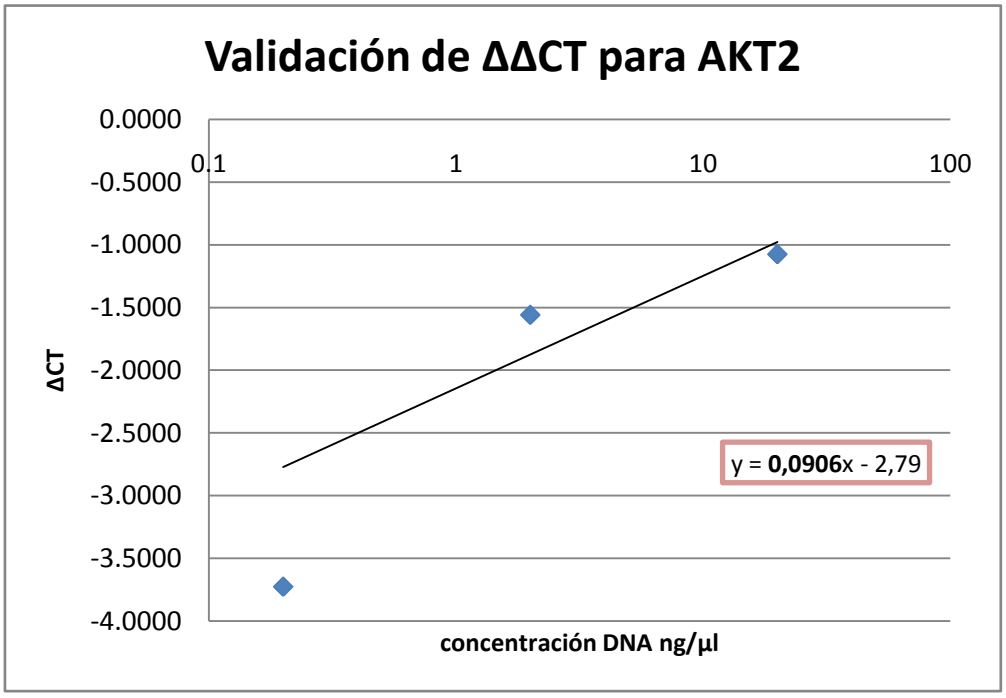
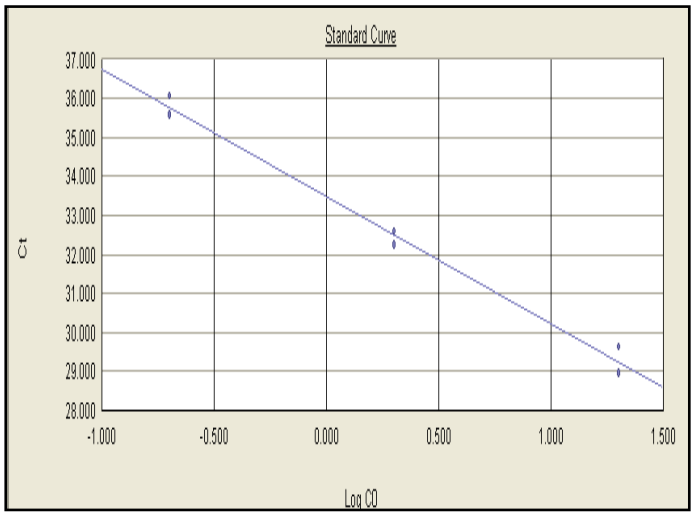
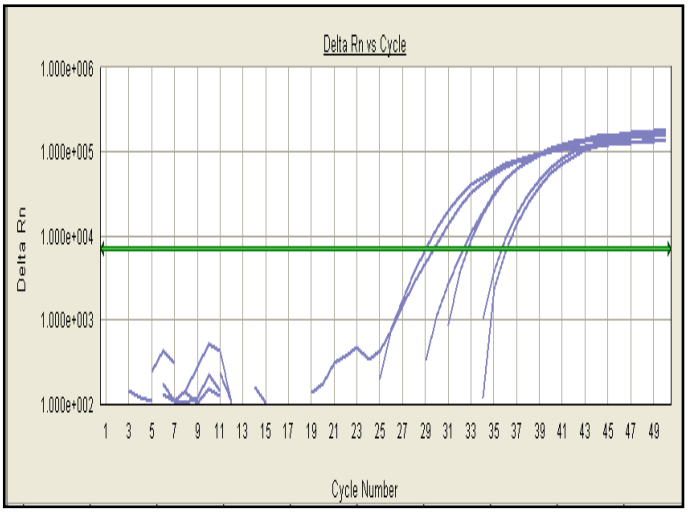


Figura 14.Validación de ΔΔCT para AKT2. Se muestra la relación Concentración DNA contra ΔCT, y se observa una pendiente menor a < 0,1

CURVA ESTÁNDAR DE MYCN



[ng/µl]	Valor de ct por duplicado para MYCN	Valor de ct promedio para MYCN
20	29,6285	29,2992
20	28,9698	
2	32,2525	32,4274
2	32,6022	
0,2	36,076	35,8290
0,2	35,5819	



Detector:	HEX
Slope:	-3,264910
Intercepto:	33,501324
R2:	0.990129

Figura 15.Curva estándar de MYCN. Arriba: Curvas de amplificación de MYCN y sus respectivos valores de CT, para las concentraciones de DNA 20, 2 y 0,2 ng/µl. Abajo: Curva estándar obtenida con los valores de CT para el gen MYCN

Los valores de C_T promedio de β-ACTINA y MYCNse usaron para hallar el ΔCT (tabla 13) y realizar la validación del método para MYCN. (Figura 14)

Concentración de DNA [ng/µl]	Valor de C_T promedio β-ACTINA	Valor de C_T promedio MYCN	ΔC_T (CT MYCN – C_Tβ-ACTINA)
20	28,5092	29,2992	0,7899
2	31,8186	32,4274	0,6088
0,2	36,3130	35,8290	-0,4841

Tabla13 :*obtención de valores ΔCT del gen MYCN respecto a β-ACTINA*

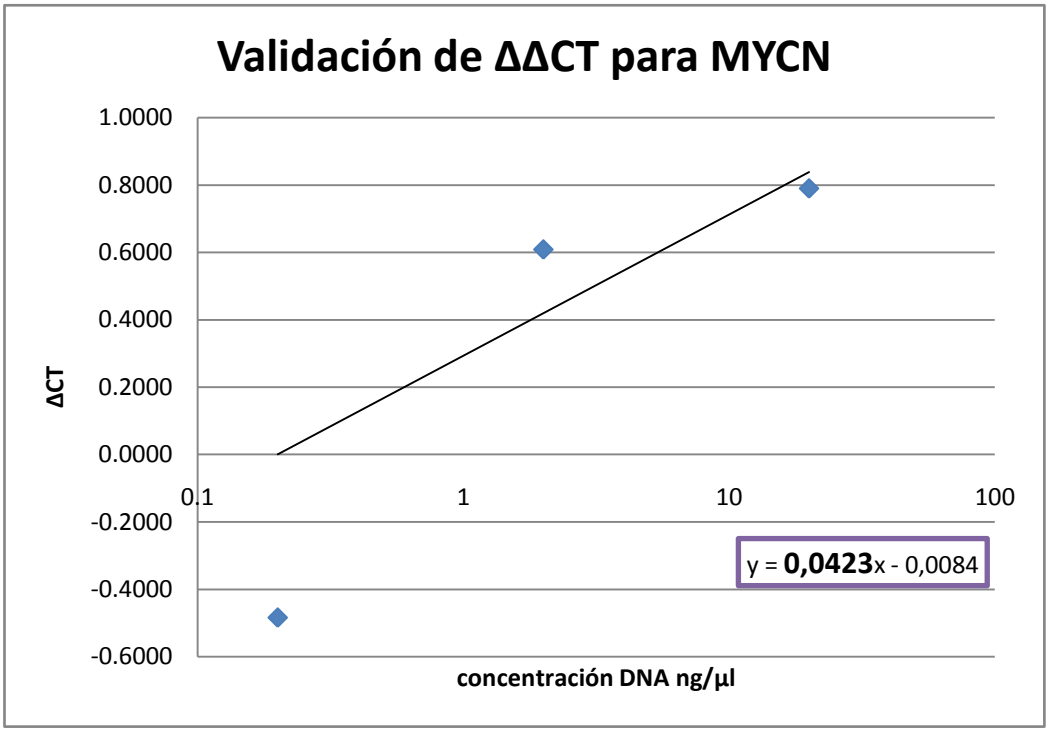
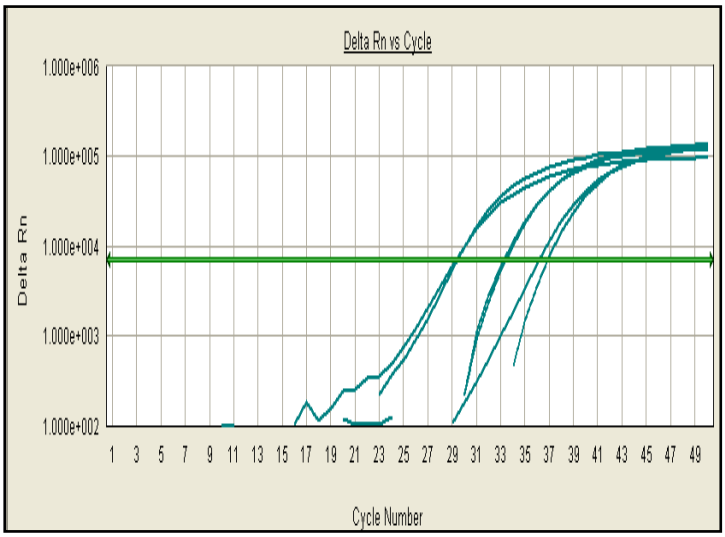
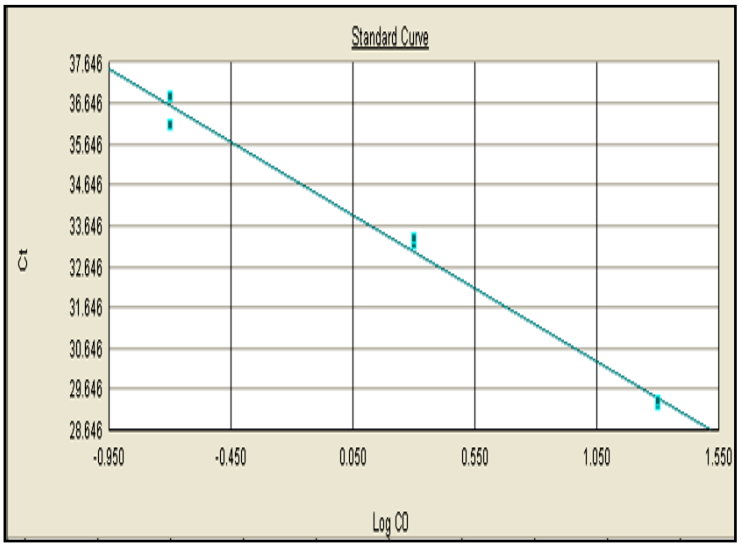


Figura 16. Validación de ΔΔCT para MYCN. Se muestra la relación Concentración DNA contra ΔCT, y se observa una pendiente menor a < 0,1

CURVA ESTÁNDAR DE MYCL



[ng/µl]	Valor de ct por duplicado para MYCL	Valor de ct promedio para MYCL
20	29,2472	29,3043
20	29,3614	
2	33,1891	33,26455
2	33,34	
0,2	36,1346	36,48045
0,2	36,8263	



Detector:	TAMRA
Slope:	-3,588081
Intercepto:	34,096542
R2:	0,991494

Figura 17.Curva estándar de MYCL: Arriba: Curvas de amplificación de MYCL y sus respectivos valores de CT, para las concentraciones de DNA 20, 2 y 0,2 ng/µl. Abajo: Curva estándar obtenida con los valores de CT para el gen MYCL

Los valores de CT promedio de β-ACTINA y MYCLse usaron para hallar el ΔCT (tabla 14) y realizar la validación del método para MYCL. (Figura 17)

Concentración de DNA [ng/µl]	Valor de CT promedio β-ACTINA	Valor de CT promedio MYCL	ΔCT (CT MYCL – CT β-ACTINA)
20	28,5092	29,3043	0,7951
2	31,8186	33,26455	1,4460
0,2	36,3130	36,4804	0,1675

Tabla14 :*obtención de valores ΔCT del gen MYCL respecto a β-ACTINA*

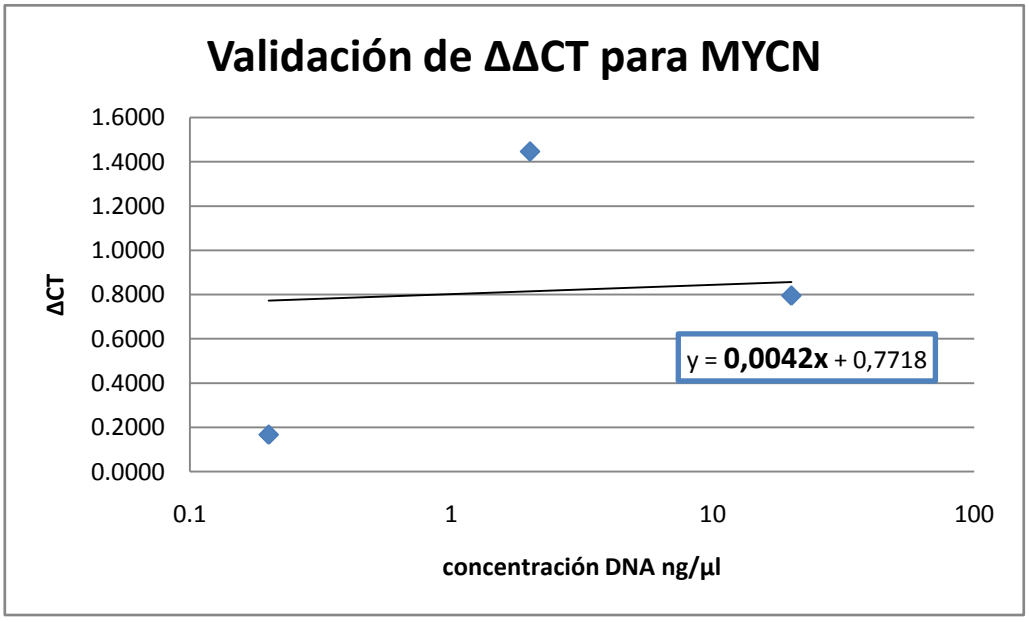


Figura 18. **Validación de ΔΔCT para MYCL**. Se muestra la relación Concentración DNA contra ΔCT, y se observa una pendiente menor a < 0,1

4.3.2RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN EN PLASMA

En DNA libre en plasma de pacientes con cáncer, AKT2 es el gen con mayor frecuencia de amplificación (44% de las muestras), seguido de MYC (31%), MYCN (29%), MYCL1 (24%) y los genes menos amplificados son ERBB2 (22%) y EGFR (15%). En plasma de voluntarios sanos, se encontraron frecuencias de amplificación del 7% para AKT2 Y MYCN, 7% MYC, 5% MYCL1, 4% EGFR, y 2% para ERBB2.

Al comparar las dosis génicas encontraras en DNA libre en plasma de pacientes con cáncer y en voluntarios sanos, los genes que presentan diferencias significativas son: AKT2 (P<0,0001),MYCL1 (P=0,0397), y ERBB2 (P=0,0065) (figura 19) (anexo 9 y 10). En la tabla 15 se puede observar que en plasma sano solo el gen EGFR presenta para una muestra una dosis génica superior a 10, mientras que en plasmas de personas afectadas por la enfermedad todos los genes arrojan resultados de alto grado de amplificación.

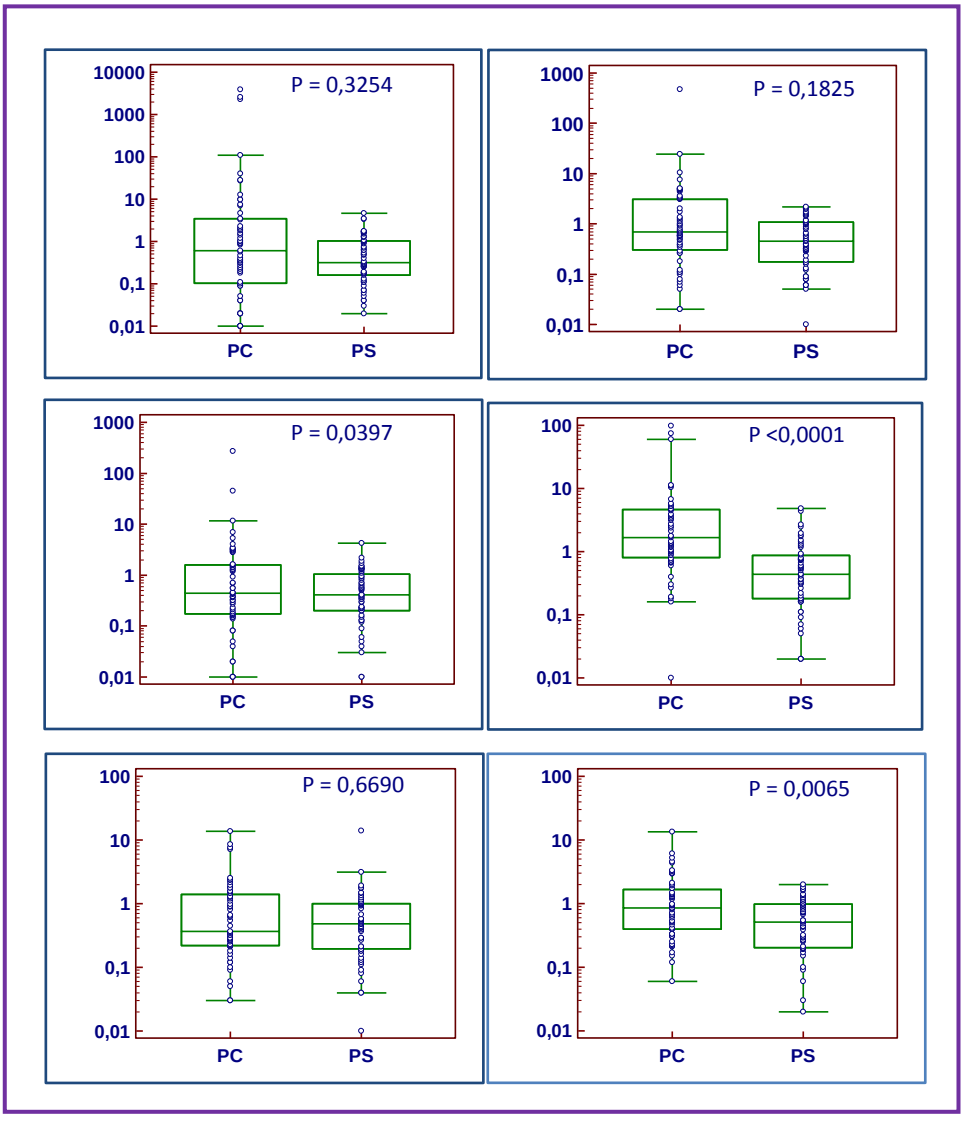


Figura 19. Caja y bigotes o Box and Whisker - Plasma Sanguíneo. Se observan los valores máximo, mínimo, mediana y distribución de los cuartiles, obtenidos para gen en plasma sanguíneo. Los valores de P se obtuvieron con el test Man-Whitney's (P < 0.05). PC= Plasmas de pacientes con Cáncer. PS= Plasma de pacientes Sanos.

4.3.3RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN EN PULMÓN

El gen amplificado con mayor frecuencia en los tumores primarios fue AKT2 (74% de las muestras), seguido de MYCL1 (56%), MYC (48%), MYCN (41%) ERBB2 (19%) y finalmente EGFR (11%).

En pulmón sano, se presentan frecuencias de amplificación más bajas: AKT2 (3%) MYCL1 (8%), MYC (3%), MYCN (3%) ERBB2 (11%) y EGFR (6%). (Tabla 15)

El test Mann-Whitney's, utilizado para el análisis de los datos, revela diferencias significativas en cuanto el número de copias encontrado en pulmón canceroso y sano, para los genes AKT2 ($P<0,0001$), MYC ($P<0,0001$), MYCN ($P=0,0006$) y MYCL1 ($P=0.0026$) pero no para EGFR ($P= 0,1200$) y ERBB2 ($P=0,8983$) (Figura20) (anexo 9 y 11). Estas diferencias son visibles en la tabla 15, donde solo una muestra de pulmón sano tiene un alto nivel de amplificación para el gen MYCL1 y ninguno de los otros genes muestra altos niveles de amplificación. Mientras que en el tumor los resultados son muy diferentes, todos los genes excepto EGFR presentan dosis génicas mayores a 10.

4.3.4 ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS MARCADORES DE AMPLIFICACIÓN.

La especificidad y sensibilidad de cada oncogén para diferenciar DNA de origen tumoral y de tejido sano, se calculó por medio de curvas ROC, en las cuales el área bajo la curva AUC es un indicativo de la capacidad de discriminación de cada marcador. Cuando un marcador es eficiente, el AUC se acerca a 1 (1= 100% de especificidad y sensibilidad), mientras que un valor de AUC cercano a 0,5 indica que no existen diferencias entre los grupos evaluados.

Los valores de AUC más altos se obtuvieron para los genes AKT2 y MYC, siendo AKT2 el que mejor discrimina DNA de origen tumoral denormal. Si este oncogén se analiza en DNA de tejido pulmonar, tiene la probabilidad del89% de clasificar correctamente un individuo sano o uno enfermo, y si se analizaen plasma sanguíneo la probabilidad es igual al 76%. Estos valores se acercan y sobrepasan en algunos casos la sensibilidad de las pruebas usadas actualmente en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

En la figura 21 se describe los valores de AUC obtenidos para cada oncogén comparando tumor respecto a tejido pulmonar sano, y en la figura 22 las valores de AUC obtenidos al comparar plasma sanguíneo de pacientes respecto a voluntarios sanos.

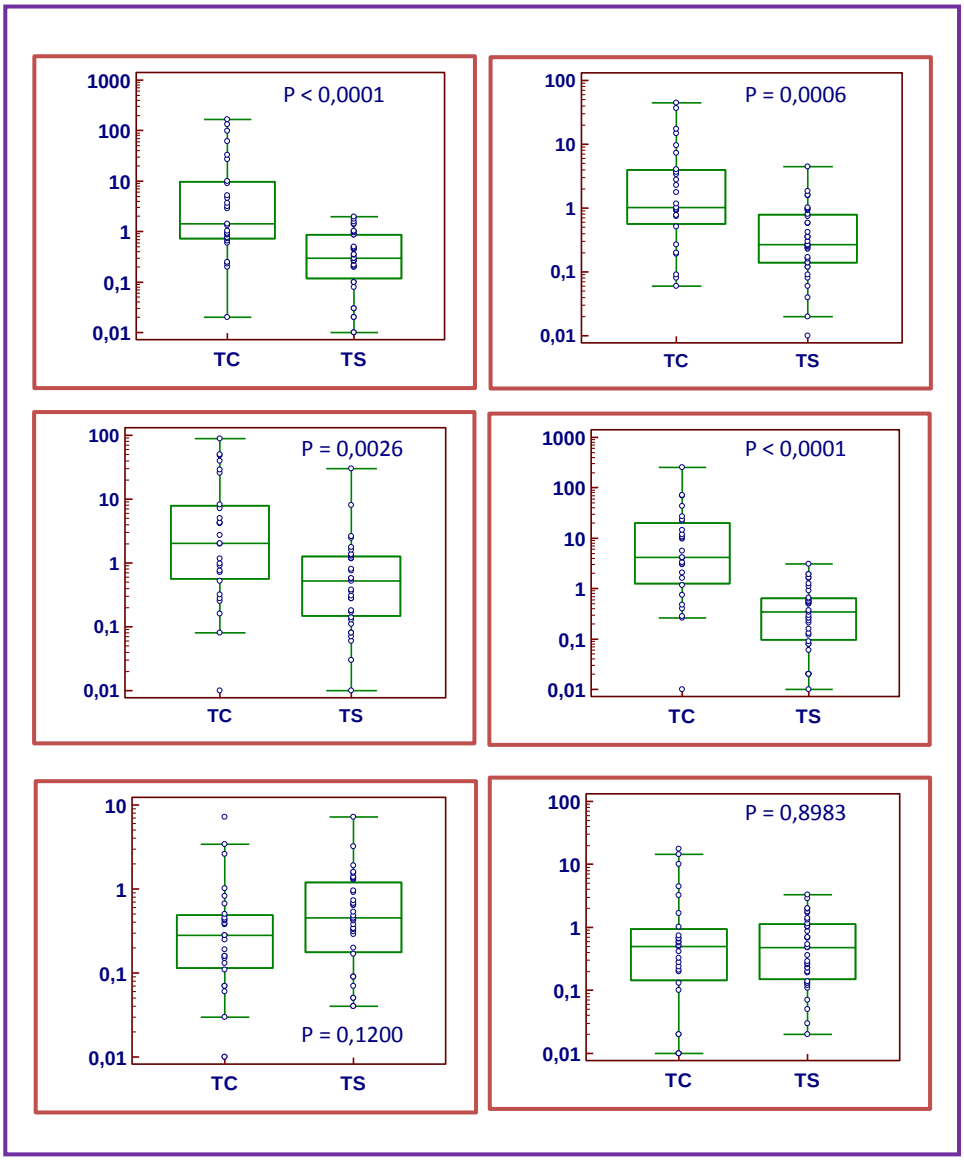


Figura 20. Caja y bigotes o Box and Whisker- Tejido Pulmonar. Se observan los valores máximo, mínimo, mediana y distribución de los cuartiles, obtenidos para para la amplificación génica en tejido pulmonar. Los valores de P se obtuvieron con el test Man-Whitney's ($P < 0.05$). TC= Tejido pulmonar con Cáncer. TS=Tejido pulmonar Sano.

MUESTRA	GENES	NO AMPLIFICADO	BAJO ≥2 < 10	ALTO ≥ 10	TOTAL GENES AMPLIFICADOS	RANGO DE AMPLIFICACIÓN [a]
TC	**MYCL1**	12 (44%)	9 (33%)	6 (22%)	15 (56%)	2 a 89
	MYCN	16 (59%)	7 (26%)	4 (15%)	11 (41%)	2 a 44
	MYC	14 (52%)	7 (26%)	6 (22%)	13 (48%)	3 a 165
	EGFR	24 (89%)	3 (11%)	0 (0%)	3 (11%)	3 a 7
	ERBB2	22 (81%)	2 (7%)	3 (11%)	5 (19%)	3 a 18
	AKT2	7 (26%)	9 (33%)	11 (41%)	20 (74%)	2 a 253
TS	**MYCL1**	33 (92%)	2 (6%)	1 (3%)	3 (8%)	2 a 29
	MYCN	35 (97%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (3%)	4
	MYC	35 (97%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (3%)	2
	EGFR	34 (94%)	2 (6%)	0 (0%)	2 (6%)	3 a 7
	ERBB2	32 (89%)	4 (11%)	0 (0%)	4 (11%)	2 a 3
	AKT2	35 (97%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (3%)	3
PC	**MYCL1**	42 (76%)	10 (18%)	3 (5%)	13 (24%)	3 a 269
	MYCN	39 (71%)	13 (24%)	3 (5%)	16 (29%)	2 a 472
	MYC	38 (69%)	9 (16%)	8 (15%)	17 (31%)	2 a 3924
	EGFR	47(85%)	7 (13%)	1 (2%)	8 (15%)	2 a 14
	ERBB2	43 (78%)	11 (20%)	1 (2%)	12 (22%)	2 a 13
	AKT2	31 (56%)	18 (33%)	6 (11%)	24 (44%)	2 a 98
PS	**MYCL1**	53 (96%)	2 (4%)	0 (0%)	2 (4%)	2 a 4
	MYCN	51 (93%)	4 (7%)	0 (0%)	4 (7%)	2
	MYC	52 (95%)	3 (5%)	0 (0%)	3 (5%)	3 a 5
	EGFR	53 (96%)	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)	3 a 13
	ERBB2	54 (98%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)	2
	AKT2	51 (93%)	4 (7%)	0 (0%)	4 (7%)	2 a 5

Tabla 15. Número de copias encontrado para cada oncogen. Se observan los valores de dosis génicas clasificados en tres categorías: no amplificado, bajo nivel de amplificación (entre 2 y 10 copias) y alto nivel de amplificación (más de 10 copias), encontrados en tejido afectado TC y plasma de pacientes con cáncerPC; tejido pulmonar sano TS y plasma de voluntarios sanosPS.,[a] En los casos que solo un gen está amplificado, el valor de $2^{-\Delta\Delta ct}$ de esa muestra se escribió en la columna Rango de amplificación.

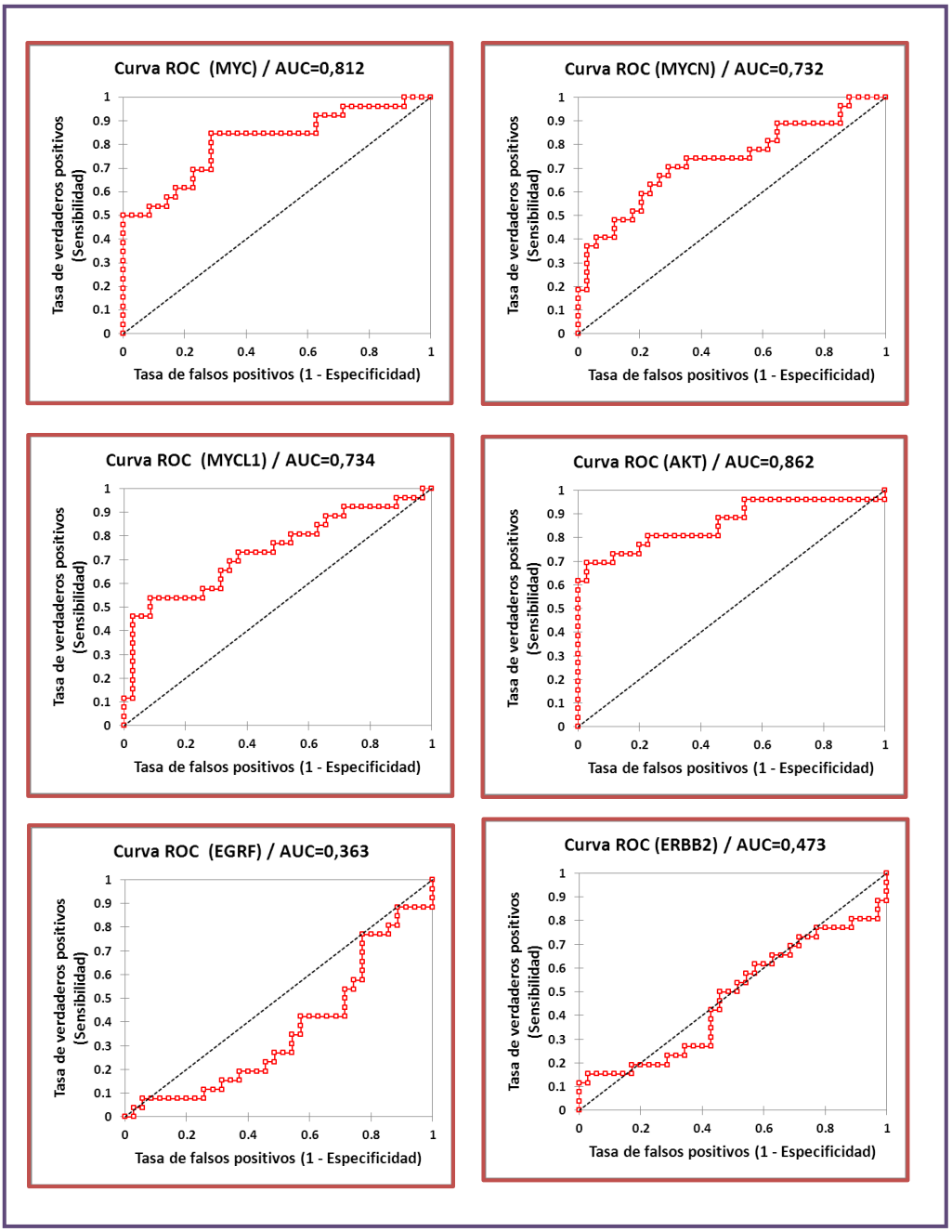


Figura 21. Curvas ROCobtenidaspara tejido pulmonar. Se observan las curvas ROC y sus respectivos valores AUC, obtenidos al evaluar tejido pulmonar sano y canceroso.

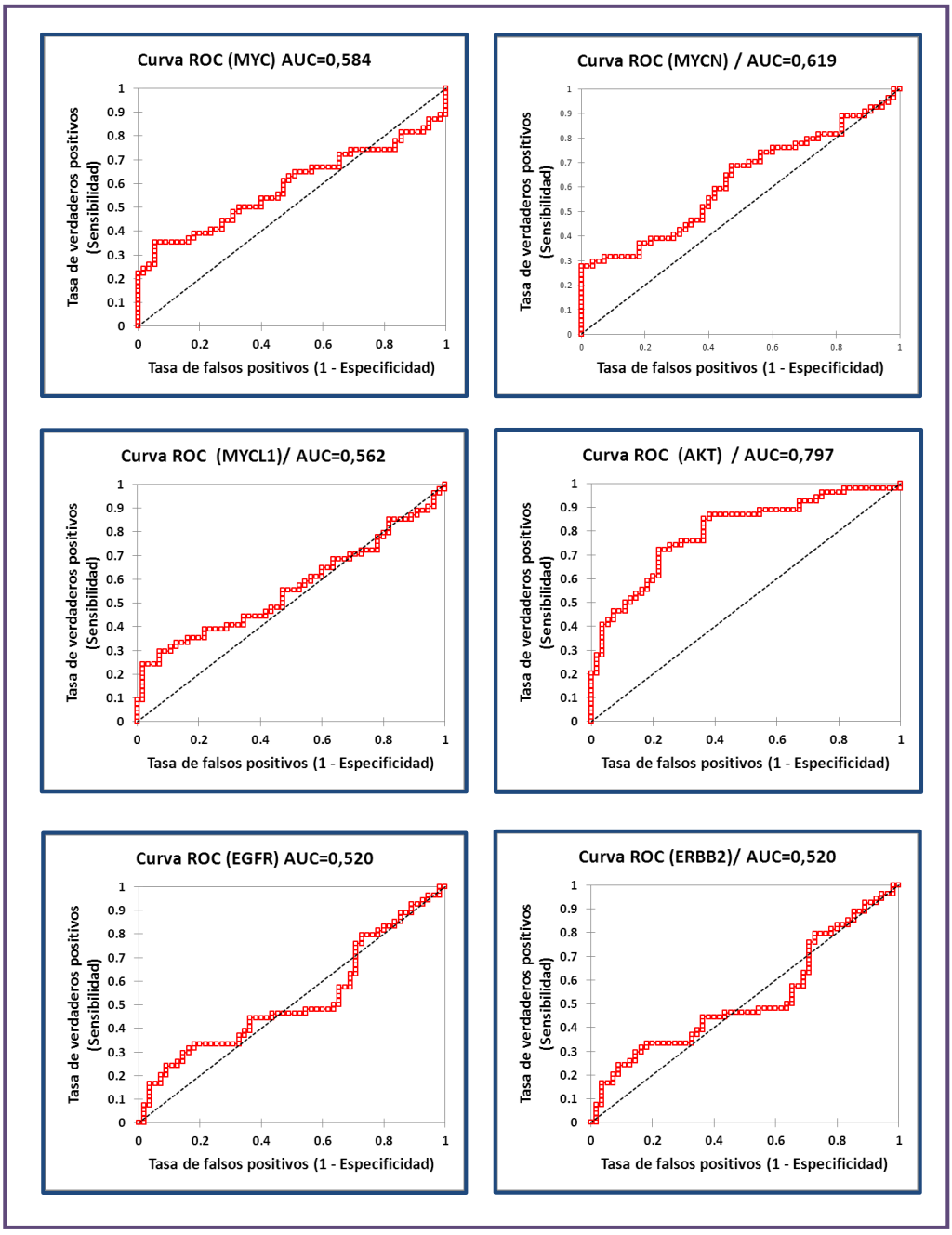


Figura 22. Curvas ROC obtenidas para plasma sanguíneo. Se observan las curvas ROC y sus respectivos valores AUC, obtenidos en plasma de pacientes con cáncer respecto a plasma de voluntarios sanos.

4.3.5 CORRELACIÓN MUESTRAS PAREADAS

MYCL1		MYCN		MYC		EGFR		ERBB2		AKT2	
PC	TC	PC	TC	PC	TC	PC	TC	PC	TC	PC	TC
0.1	39.9	0.3	44.5	0.0	0.9	1.0	3.4	6.1	4.5	1.4	3.3
0.0	0.9	0.1	3.7	0.0	0.8	0.1	0.3	1.4	0.7	0.7	4.1
0.1	2.0	0.1	9.6	0.0	0.6	1.6	0.5	3.2	3.2	1.2	2.1
0.4	0.5	0.8	0.9	0.0	0.0	0.6	0.4	1.3	0.5	1.1	0.4
0.0	0.7	0.1	1.8	0.0	0.3	0.0	0.2	0.9	0.1	4.8	10.6
0.6	5.0	0.6	1.2	28.5	0.9	2.4	2.6	2.9	14.4	59.5	253.2
4.1	29.1	3.6	2.8	27.1	131.5	2.0	0.1	0.8	0.2	5.8	23.2
2.9	4.2	3.3	1.0	2.3	32.6	0.3	0.1	0.4	0.6	0.7	0.3
0.0	4.2	0.1	4.0	0.0	1.0	1.3	0.2	4.6	0.5	1.8	1.6
6.9	7.2	5.0	14.9	12.6	3.1	0.3	7.2	1.2	17.8	5.2	72.7
0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	2.9	1.8	0.4	5.3	10.1	6.7	17.4
3.4	4.2	1.0	0.5	9.6	4.6	0.3	0.1	1.3	0.0	1.2	0.3
3.0	8.2	4.8	3.4	0.6	26.7	0.3	0.8	0.2	0.1	0.6	0.7
5.3	2.7	7.5	7.3	0.1	0.9	1.8	0.0	3.0	0.0	1.7	0.5
0.1	1.2	0.6	2.3	1.5	1.4	0.3	0.3	1.0	1.7	2.4	11.9
0.2	26.0	0.1	0.9	3.3	3.6	1.2	0.1	0.2	0.7	3.3	14.6
0.3	2.0	0.9	1.0	1.9	0.2	0.1	0.7	0.7	0.7	2.5	10.2
0.2	89.2	0.7	36.8	3.5	60.9	0.7	0.0	0.4	0.3	0.8	5.6
0.3	0.3	0.1	0.3	0.5	0.7	0.3	0.4	0.1	0.3	1.7	1.2
0.3	0.1	0.5	0.2	0.1	0.7	0.5	0.2	0.8	0.0	0.2	0.0
0.2	0.2	1.3	0.7	4.6	9.0	2.3	0.3	1.7	0.2	4.6	4.1
0.4	50.5	3.1	17.4	2261.1	9.9	0.3	0.4	0.5	1.0	1.0	3.0
0.7	0.8	0.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.1	0.3	0.0	1.3	3.1
1.3	1.0	0.4	0.9	1.8	1.3	0.1	1.0	0.4	0.4	3.1	9.8
1.4	0.2	0.5	0.1	0.2	5.2	0.4	0.2	1.0	0.2	0.9	22.2
1.6	48.7	0.7	0.1	2598.6	165.4	0.0	0.0	0.4	0.0	74.0	43.0
1.3	0.0	0.8	0.1	3924.1	99.3	0.2	0.4	0.5	0.6	2.7	27.2
(rho) =0,478 P=0,0117		(rho) =0,463 P= 0.0149		(rho) =0,710 P<0,0001		(rho) =0,250 P=0,2085		(rho) =0,663 P=0,0002		(rho) =0,529 P=0,0045	

Tabla 16. Número de copias génicas encontrado en las muestras pareadas TC-PC.(rho)= coeficiente de correlación de Spearman y P= nivel de significancia.

Los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$correspondientes a las 27 muestras pareadas (TC-PC) se observan en la tabla 16. Para evaluar si el estado de amplificación ocogénica del tumor se puede detectar en plasma del mismo paciente, se estimó el coeficiente de correlación de Spearman. Él análisis se hizo categorizando los datos en dos grupos. 1= no amplificado y 2= amplificado.

Para todos los genes excepto EGFR se observa correlación positiva en el estado de amplificación detectado en las muestras pareadas plasma-tumor, con valores de P estadísticamente significativos, lo cual evidencia la capacidad del plasma para revelar el estado de amplificación oncogénica del tumor pulmonar.

En la tabla 17 se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los 6 genes, para detectar en plasma el estado de amplificación del tumor. La sensibilidad más alta se observa para los genes ERBB2 (80%) MYC (70%) y AKT (60%), valores que confirman las correlaciones de Sperman, donde éstos 3 genes tienen correlaciones positivas y significancias estadísticas más altas. Articulando éstas observaciones con los resultados anteriores donde se concluyó que el gen AKT2 es el que mejor discrimina entre muestras biológicas sanas y muestras con cáncer. Se puede concluir que la detección de amplificación del gen AKT2 en plasma podría ser útil en población colombiana para el diagnóstico del cáncer pulmonar.

GEN	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
MYCL1	40 (20, 64)	100 (71, 100)	100 (100, 100)	57 (36, 78)
MYCN	45 (21, 72)	94 (69, 100)	83 (54, 100)	71 (52, 91)
MYC	77 (49, 92)	93 (66, 100)	91 (74, 100)	81 (62, 100)
EGFR	33 (6, 80)	92 (73, 99)	33 (0, 87)	92 (81, 100)
ERBB2	80 (36, 97)	91 (71, 98)	67 (29, 100)	95 (86, 100)
AKT	60 (39, 78)	100 (59, 100)	100 (100, 100)	47 (21, 72)

Tabla 17.Evaluación del plasma para predecir el estado de amplificación de los 6 genes encontrado en tumor. VPP= valor predictivo positivo. VPN = valor predictivo negativo. Se describe entre paréntesis los límites inferior y superior correspondientes a un intervalo de confianza del 95%.

4.4. CORRELACIÓN MARCADORES MOLECULARES Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS.

Los análisis de correlación de los marcadores moleculares respecto a las características clinicopatológicas de los pacientes, se realizaron usando los resultados obtenidos en tejido tumoral, se aplicó el test exacto de Fisher y con un intervalo de confianza del 95%, se encontró que la amplificación de AKT2 se correlaciona con el sexo masculino (p= 0,0002), de los 8 tumores primarios provenientes de mujeres ninguno mostró amplificación, mientras que de los 19 provenientes de hombres 15 mostraron amplificación de este gen. Para los otros marcadores, tanto de metilación como amplificación, no se encontró correlación con el sexo, tipo histológico, ni con el grado de diferenciación celular, como se observa en la tabla 18.

	SEXO	EDAD	DIF	T. H
M. AMPLIFICACIÓN				
MYCL1	1	0.2	0.6	1
MYCN	1	0.7	1	1
MYC	1	0.4	1	0.5
EGRF	0.5	1	1	1
ERBB2	0.2	0.8	0.5	1
AKT2	**0.0002**	0.4	0.2	1
M. METILACIÓN				
MGMT	1	0,6	0.6	1
FHIT	1	1	0.4	1
P16	1	0.2	0.5	1
APC	0.6	1	1	1
RASSF1	0.6	0.3	0.1	1
TIMP2	0.1	1	1	1

Tabla 18. Asociación de marcadores con características clinicopatológicas. Se muestran los valores de P obtenidos con el test exacto de Fisher, al evaluar posibles asociaciones entre los genes y los datos disponibles en las historias clínicas. DIF: grado de diferenciación del tumor. T.H: Tipo histológico.

5. DISCUSIÓN

5.1 MARCADORES DE METILACIÓN

En el presente trabajo seevaluó si el estado de metilación de los genes supresores tumorales MGMT, FHIT, P16, APC, RASSF1, TIMP2, permite "biomarcar" el cáncer pulmonar en una muestra de población Colombiana.

Existen numerosas publicaciones provenientes principalmente de países desarrollados, en las que éstos genes se describen metilados y se ha descritosu utilidad en diagnóstico, pronóstico y como marcadores de recurrencia del cáncer pulmonar[128][74]. Pero es necesario conocer si los resultados publicados son aplicables a población Colombiana, ya que los procesos epigenéticos, como la hipermetilación de promotores génicos, son regulados por factoresambientales,como la exposición a contaminación ambiental, a humo de cigarrillo, incluso se ha descrito que están influenciados por la dieta, la obesidad, y el estrés[129].

Así mismo, los estudios de marcadores de metilación normalmente usan como control tejido pulmonar normal adyacente al tumoral, en los que se detectan frecuencias de metilación entre el 15% y 53%paralos genes mencionados[83].La explicación a estos hallazgos es que la metilación génica es un evento preneoplásico o que probablemente hay infiltraciones no detectables por estudios citológicos. Para descartar éstas dudas, en esta investigación se utilizó como control tejido pulmonar normal, proveniente de personas que no tuvieran en sus historias clínicas registro de haber sufrido cáncer.

Adicionalmente, en este estudio se evaluó si la metilación del pulmón es detectable en DNA libre en plasma sanguíneo del mismo paciente, con el objetivo de evaluarsi esta muestra biológica de obtención no invasiva es útil en el diagnóstico del cáncer pulmonar.

De los 6 genes evaluados para metilación, 5 se encontraron metilados tanto en DNA de pacientes sanos, como DNA de pacientes con cáncer, sin embargo, el gen RASSF1 no se encontró metilado en tejido pulmonar normal y sólo se detectó metilado en una muestra de plasma proveniente de voluntarios sanos. Probablemente una exposición medioambiental común, por ejemplo contaminación derivada de carros, industria, alimentación, genere que en pulmón sano también se detecte metilación. Sin embargo, como se observa en la tabla 6 para los genes p16, APC, RASSF1 Y TIMP2, es más frecuente encontrar en DNA proveniente de personas sanas, tanto alelos metilados como no metilados, mientras que en muestras provenientes de pacientes con cáncer, es más

frecuente encontrar solo alelos metilados, lo que apoya la teoría del doble golpe descrita por Knudson. Igualmente, se podría sospechar que en plasma se está detectando DNA proveniente de tejidos diferentes a pulmón que posiblemente cuentan con procesos de recambio mayores.

La metilación también se ha asociado con la edad, por lo que se realizó un análisis, clasificando los plasmas de voluntarios sanos en 3 grupos: primero: entre 20 y 40 años, segundo: entre 41 y 60 años y tercero: de 61 años en adelante, y se realizó un test exacto de Fisher donde el estado de metilación de los 6 genes supresores no se asoció a ningún grupo de edad. La metilación en plasma de voluntarios sanos tampoco se asoció al hecho de tener familiares con cáncer.

Sin embargo, sería importante realizar un estudio cuantitativo que permita diferenciar si la posición, cantidad de islas y alelos metilados difieren entre pacientes sanos y enfermos, ya que la técnica PCR específica para metilación (MSP) empleada, es muy sensible, capazde detectar un alelo metilado entre 1000 no metilados[130], por lo que es muy útil para el análisis de metilación en muestras con bajo contenido de DNA como los bloques de parafina, pero no arroja valores cuantitativos, importantes para determinar diferencias entre personas afectadas por la enfermedad respecto a sanas.

El gen RASSF1 fue el único que no se encontró metilado en tejido pulmonar normal y solo se detectó metilado en una muestra de plasma proveniente de voluntarios sanos, generando un OR de 33 o 9 si está metilado en tumor o plasma respectivamente. Lo que indica que evaluar RASSF1 en población expuesta a factores asociados al cáncer pulmonar, (como el humo de cigarrillo,asbesto,radón,arsénico, berilio, cromo, níquel, contaminación del aire, y radiación ionizante) podría ser de utilidad entamizajespara identificar personas que tengan riesgos elevados de padecer la neoplasia y tomar medidas preventivas. Adicionalmente, este tamizaje podría realizarse en plasma sanguíneo, ya que como se observó en los estudios de correlación plasma-pulmón, el estado de metilación de RASSF1 tiene un valor de Rho igual a 0.723, lo que indica que el plasma es una muestra adecuada para detectar si RASSF1 está metilado en pulmón y así evitar procedimientos invasivos como la broncoscopia o las biopsias de pulmón.

En general, el plasma podría considerarse una muestra biológica de gran utilidad para la detección de marcadores moleculares del cáncer de pulmón, de los 6 genes evaluados, 4 mostraron correlación entre pulmón y plasma, especialmente el gen APC, con un Rho= 0.824. Es importante seguir en la búsqueda de marcadores del cáncer pulmonar, que tengan sensibilidad y especificidad para discriminar tejido tumoral de normal, y evaluarlos en muestras de obtención no invasiva como el plasma sanguíneo.

Al analizar los resultados obtenidos en esta investigación y los encontrados en otros reportes para tejido tumoral, se observa que las frecuencias de metilación varían dentro de rangos muy amplios, por ejemplo se encontró metilado MGMT y P16 en el 42% de las muestras, seguidos de RASSF1 (31%), APC, FHIT (27%), y TIMP2 (27%) y los reportes varían para MGMT entre 8% a 64%, p16 25% a 53%, RASSF1 24 al 48%, APC 25 a 57%, FHIT 0% a 39%, y finalmente TIMP2 en el 5% y 26% de las muestras[83], [131], [132], [51][133][134][135][136].

Con el test de Fisher no se detectó asociacióndel estado de metilación de los genes evaluados, y las características edad, sexo, histología, y grado de diferenciación del tumor (tabla 18), éstos resultados coinciden con los reportados por Belinsky A. y colaboradores en el 2006 [137], Sin embargo Yanaguana en el 2003[131] encontró que la metilación de p16 es más frecuente en carcinoma escamocelular, mientras que la de APC es más frecuente en Adenocarcinomas. Es importante tener en cuenta que el tamaño muestral de éste estudio y la cantidad de tipos histopatológicos incluidos dificulta identificar asociaciones entre metilación e histopatología. Sumado a esto la cantidad de información incluida en las historias clínicas no permite realizar asociaciones respecto a factores de exposición, tasa de sobrevida, e historia familiar de cáncer.

5.2 AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA

En cuanto a los marcadores de amplificación se evaluó el número de copias de los genes MYCL1, MYCN, MYC, EGFR, ERBB2 y AKT2en una muestra de población Colombiana con cáncer pulmonar. El gen amplificado con mayor frecuencia en los tumores primarios estudiados fue AKT2 (74%). Este gen ubicado en el cromosoma 19 (19q13.1- q13.2), codifica una proteína citosólica que es activada mediante cascadas de señalización, corriente abajo de receptores de factores de crecimiento como EGFR y ERBB2, juega un papel muy importante en la fisiología de la célula normal y tumoral, incluyendo la modulación de crecimiento, sobrevida, proliferación y metabolismo[138].

Aplicando el test exacto de Fisher y con un intervalo de confianza del 95%, se encontró que la amplificación de AKT2 se correlaciona con el sexo (p= 0,0002), de los 8 tumores primarios provenientes de mujeres ninguno mostró amplificación, mientras que de los 19 provenientes de hombres 15 mostraron amplificación de este gen. Sin embargo, no pudo encontrase correlación con el tipo histológico, ni con el grado de diferenciación.

La amplificación de AKT2 es, altamente sensible y específica (AUC=0.86) para distinguir DNA proveniente de pulmón sano y de pulmón canceroso, esta sensibilidad se conserva al evaluar DNA libre en plasma de pacientes y de voluntarios sanos (AUC=0.79). Resultado que abre puertas a alternativas de

diagnóstico menos invasivas que las usadas actualmente para la detección del cáncer de pulmón. Este resultado podría aplicarse fácilmente en la práctica clínica, ya que existen sistemas establecidos para cuantificar el número de copias génicas como son PCR, FISH, entre otros y al ser una característica que no se modifica con el tiempo y procesamiento de las muestras, si tenemos en cuenta que se estudiaron muestras congeladas desde el año 2004. Sin embargo, el diagnosticar a partir de marcadores moleculares presenta límites, como la poca cantidad de DNA libre en plasma de origen tumoral en las primeras etapas del cáncer y la incapacidad para dar información acerca de la localización del tumor en el pulmón, por lo que podría ser un método de diagnóstico complementario a técnicas de imagenología.

AKT2 se ha descrito amplificado en otros tipos de cáncer como ovario[139], páncreas [140] y sobreexpresado en cáncer colorectal[141] y cáncer de pulmón [142], lo que demuestra su importancia en los procesos neoplásicos.

Los genes EGFR y ERBB2, son receptores tirosina quinasa de la superficie celular, activan importantes vías de señalización que regulan procesos como la proliferación, apoptosis, angiogénesis[143], la heterodimerización de estos dos receptores causa una potente activación de EGFR. En este estudio EGFR y ERBB2 se encontraron amplificados en el 11% y 19% de las muestras, respectivamente. Para EGFR se reporta comúnmente frecuencias de amplificación entre 11-40%, y de sobreexpresión entre 40 y 80% [144], [145] y para ERBB2 amplificación entre 5 y 10%, y porcentajes de sobreexpresión entre el 17% y 30%. [143], [146], [147]. Sin embargo, nuestros resultados muestran que también se encuentran amplificados del 6 a 11% en pulmón sano y que no son marcadores adecuados para cáncer de pulmón. La literatura científica muestra que pacientes con éstos dos genes amplificados, responden mejor a inhibidores tirosina kinasa como GefitinibyErlotinib. En esta población se observó alta asociación entre el estado de amplificación de EGFR y ERBB2 con un coeficiente de correlación de Sperman de 0.74 ($p<0.0001$), lo que hace pensar que en población colombiana éstos genes no serían de utilidad para el diagnóstico pero si para hacer tamizajes genéticos y seleccionar pacientes a tratar con inhibidores tirosina quinasas en los cuales este tipo de tratamientopodría funcionar eficientemente al existir esta alta correlación.

Los otros tres genes estudiados MYCL1, MYCN, MYC, codifican para factores de transcripción, cuyos blancos son genes importantes para proliferación, apoptosis y diferenciación celular[148]. Estos genes los encontramos amplificados en tumores primarios en un 56%, 41% y 48% respectivamente. Y se encontró correlación entre los genes MYCL1 y MYCN (coeficiente 0,19 y p= 0, 023). A pesar de que los tres genes tienen sensibilidades altas para diferenciar pulmón sano y con cáncer (AUC >0.73), al evaluarlos en DNA libre en plasma, esta sensibilidad disminuye, reflejada en valores de AUC entre 0,5 y 0,6. Sería importante evaluarlos en otro

tipo de muestras biológicas de obtención no invasiva como el esputo, saliva, orina o fluido crevicular.

Finalmente una mejor articulación de la investigación básica con la práctica clínica, podría generar resultados más amplios en el momento de hacer correlaciones con aspectos como etapa del tumor, metástasis, tiempo de seguimiento del paciente, sustancias a las que estaba expuesto, historia familiar con cáncer. Datos que en algunas ocasiones se omiten en la historia clínica.

CONCLUSIONES

- El gen supresor RASSF1 está metilado diferencialmente en muestras de plasma y tejido pulmonar proveniente de pacientes con cáncer y personas sanas, constituyendo una herramienta potencial para el diagnóstico del cáncer pulmonar en Colombia.

- La metilación de RASSF1A es específica de tejido pulmonar con cáncer. Si éste gen se detecta metilado en pulmón, hay 33 veces más probabilidad de que este tejido sea tumoral frente a un tejido que no lo tenga metilado. Si el análisis se realiza a partir de plasma sanguíneo el OR es igual a 9.

- Cuando los genes p16, APC, y TIMP2 se detectan metilados en población sana, frecuentemente se detecta también el alelo no metilado, mientras que en pacientes con cáncer de pulmón, es más frecuenteencontrar solo alelos metilados para estos genes.

- Los oncogenes AKT2 y MYCL1, presentan diferencias significativas en cuanto al el número de copias existente tanto en plasma sanguíneo como tejido pulmonar, proveniente de pacientes con cáncer de pulmón y personas sanas, constituyendo una herramienta potencial para el diagnóstico del cáncer pulmonar en Colombia.

- El número de copias génicas de AKT2,exhibe una alta sensibilidad (entre el 76% y 89%) para diferenciarhombres sanos y hombres con cáncer pulmonar. Estos valores se acercan y sobrepasan en algunos casos la sensibilidad de las pruebas usadas actualmente en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

- La amplificación de AKT2 se correlaciona con el sexo masculino. El resto de marcadores analizados, no se correlaciona con sexo, edad, tipo histológico, ni con el grado de diferenciación celular.

- Existe una fuertecorrelación entre el estado de amplificación de los oncogenes EGFR y ERBB2, por lo que podrían ser de utilidad en tamizajes genéticos y selección de pacientes a tratar con inhibidores tirosina quinasas, ya que se ha descrito la alta eficiencia de éstos inhibidores en pacientes que tienen amplificados los dos oncogenes.

- El plasma podría considerarse una muestra biológica de gran utilidad para la detección de marcadores moleculares del cáncer de pulmón, de los 12 genes

evaluados, 9 mostraron correlación entre pulmón y plasma. La ventaja del análisis de biomarcadores en muestras de sangre, es la facilidad de obtener y procesar las muestras y la mínima invasividad que presenta para el paciente.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el estado de metilación de RASSF1 y el grado de amplificación de AKT2 en un mayor número de pacientes, para determinar el poder de detección de éstos marcadores.

- Evaluar el grado de metilación de los genes supresores tumorales, por métodos cuantitativos, como secuenciación, para determinar si la cantidad y posición del sitio CpG metilado, difiere entre pacientes sanos y personas con cáncer.

- Evaluar los marcadores RASSF1 Y AKT2, en población Colombiana afectada por cáncer en otros órganos, para determinar si son específicos de Pulmón.

- Realizar estudios bioinformáticos que permitan comparar los resultados obtenidos en esta investigación con otras poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Roy S. Herbst, M.D., Ph.D., John V. Heymach, M.D., Ph.D., and Scott M. Lippman, M.D.***Molecular Origins of Lung Cancer.* 2008. pág. 359. Vol. 13.

2. **Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM.***GLOBOCAN 2008 Cancer Incidence and Mortality Worldwide.* 2008. Available from: http://globocan.i.

3. **Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al.***SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute, Bethesda, MD, seer.cancer.gov/csr/1975_2005/.* 2008.

4. **Bilello KS, Murin S, Matthay RA.***Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer.* 2002. págs. 1-25. Vol. 23.

5. **O'Reilly, KM y Mclaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ.***Asbestos-related lung disease.* 2007. págs. 683–688. Vol. 75 (5).

6. **Catelinois O, Rogel A, Laurier D, Billon S, Hemon D, Verger P, Tirmarche M.***Lung cancer attributable to indoor radon exposure in france: impact of the risk models and uncertainty analysis.* 2006. págs. 1361–6. Vol. 114 (9).

7. **Kabir, Z y Bennett K, Clancy L.***Lung cancer and urban air-pollution in dublin: a temporal association.* 2007. págs. 367–369. Vol. 100 (2).

8. **Travis, WD y Travis LB, Devesa SS.***Lung cancer.* 1995. págs. 191–202. Vol. 75.

9. **Garber M, Troyanskaya O, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna M, Van M, Rosen G, Perou C, Whyte R, Altman R, Brown P, Botstein D, and Peterseni.***Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung.* 2001. págs. 13784-13789. Vol. 98.

10. **Albertson, DG.***Gene amplification in cancer.* 2006. págs. 447-55.

11. **Baylin S, Herman J, Graff J, Vertino P, Issa J.***Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia.* 1998. págs. 141-96. Vol. 72.

12. **PW., Jones PA and Laird.***Cancer epigenetics comes of age.* 1999. págs. 167-167. Vol. 21.

13. **Jacob, Sam.***Atlas de Anatomía Humana.* s.l. : Elsevier, 2002. pág. 66.

14. **Stevens, Alan. Lowe, James.***Histología Humana.* España : Elsevier, 2006. págs. 177-179.

15. **Moore, Keith L y Agur, Anne M. R.***Essencial Clinical Anatomy.* s.l. : Lippincott Williams y Wilkins, 2007. pág. 78.

16. **Baynes J, Dominiczak M.***Bioquímica médica.* España : Elsecier, 2005. págs. 340-341.

17. **Peña, Carmen Eugenia.** Biología , Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería. [En línea] UNAD. [Citado el: 27 de Oct de 2010.] http://www.unad.edu.co/curso_biologia/tejorgsist.htm .

18. **Ross, Michael H., Pawlina Wojciech.***Histología. Texto y atlas a color con Biología Celular y Molecular.* 5ª edición. s.l. : Panamericana, 2008. págs. 669-673.

19. **Minna, JD y Harrison's, Schiller JH.***Principles of Internal Medicine (17th ed.).* s.l. : McGraw-Hill., 2008. págs. 551–562.

20. **Ramirez, José.***CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA Y LESIONES PRENEOPLÁSICAS EN CÁNCER DE PULMÓN.* Barcelona : s.n., 2005. págs. 85-87.

21. **Kerr KM, Carey FA, King G, Lamb D.***Atypical alveolar hyperplasia: relationship with pulmonary adenocarcinoma, p53, and c-erb-2 expression.* 1994. págs. 249–256.

22. **Brambilla E, Travis W, Colby T, Corrinz B, Shimosato Y.***The new World Health Organization classification of lung tumours.* 2001. págs. 1059-1068.

23. **Collins L, Haines C, Perkel R, Enck R.***Lung Cancer: diagnosis and management.* 2007. págs. 56-63. Vol. 75.

24. **Kreyberg L, Liebow AA, Uehlinger EA.***International Histologic Classification of Tumours: No. 1. Histological Typing of Lung Tumours.* s.l. : Geneva: World Health Organization, 2nd ed, 1981.

25. **Hinson J, Perry M.***Small cell lung cancer.* 1993. págs. 216-225. Vol. 43.

26. **Midthun DE, Jett JR.***Clinical presentation of lung cancer. In: Lung Cancer: Principles and Practice. .* s.l. : Lippincott-Raven, 1996. pág. 421.

27. **Jr., Patz EF.***Imaging bronchogenic carcinoma.* 2000. págs. 90S-5S. Vol. 117(4 suppl1).

28. **DeMarini, DM.***Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review.* 2004. págs. 447-74. Vol. 567.

29. **Thun, MJ y Hannan LM, Adams-Campbell LL et al.***Lung Cancer Occurrence in Never-Smokers: An Analysis of 13 Cohorts and 22 Cancer Registry Studies.* 2008. pág. 5(9): e185. . doi:10.1371/journal.pmed.0050185 .

30. **Holford, T.R., Zhang Z., Zheng T., and McKay L.A.***A model for the effect of cigarette smoking on lung cancer incidence in Connecticut.* 1996. págs. 565-80. Vol. 15.

31. **Gorlova, OY y Weng SF, Zhang Y et al.***Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients.* 2007. págs. 111–118. Vol. 121.

32. **Rivera MP, Detterbeck F, Mehta AC.** For the American College of Chest Physicians. Diagnosis of lung cancer: the guidelines. 2003, Vol. 123(1 suppl), págs. 129S-36S.

33. **Montuenga, LM and Mulshine JL.***New molecular strategies for early lung cancer detection.* 2000. págs. 555-63. Vol. 18.

34. **Sozzi, G. et al.***Quantification of free circulatingDNAas a diagnostic marker in lung cancer.* 2003. págs. 3902–3908. Vol. 21.

35. **Jahr, S. et al.***DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells.* 2001. págs. 1659–1665. Vol. 61.

36. **Schmidt B, Weickmann S, Witt C, and Fleischhackerb M.***Integrity of Cell-Free Plasma DNA in Patients with Lung Cancer and Nonmalignant Lung Disease.* 2008. págs. 207-213. Vol. 1137.

37. **Qian An, Yong Liu, Yanning Gao, Jinfeng Huang, Xiaoli Fong, Ling Li, Dechao Zhang, Shujun Cheng.***Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients.* 2002. págs. 109-114. Vol. 188.

38. **Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, Leon M, Ratcliffe C, Roz L, Pelosi G, Goldstraw P, Sozzi G, and Pastorino U.***Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers.* 2004. págs. 91–96. Vol. 108.

39. **Dulaimi, E. et al.***Tumour suppressor gene Promotor hypermethylation in serum of breast cancer patients.* 2004. págs. 6189–6193. Vol. 10.

40. **Papadopoulou E, Davilas E, Sotiriou V, Georgakopoulos E, Georgakopoulou S, Koliopanos A, Aggelakis F, Dardoufas K, Agnanti NJ, Karydas I, Nasioulas G.***Cell-free DNA and RNA in Plasma as a New Molecular Marker for Prostate and Breast Cancer.* 2006. págs. 235–243. Vol. 1075.

41. **Caldas, C.***Molecular assessment of cancer.* 1998. págs. 1360-3. Vol. 316.

42. **Fong F, Zimmermann P, Smith P.***Lung pathology: the molecular genetics of non-small-cell lung cancer.* 1995. págs. 295-301. Vol. 27.

43. **Wistuba II, Mao L, Gazdar AF.***Smoking molecular damage in bronchial epithelium.* 2002. págs. 7298-306. Vol. 21.

44. **Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD.***A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer.* 2007. págs. 327-43. Vol. 2.

45. **Park IW, Wistuba II, Maitra A, et al.***Multiple clonal abnormalities in the bronchial epithelium of patients with lung cancer.* 1999. págs. 1863-8. Vol. 91.

46. **Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al.***EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients.* 2005. págs. 7568-72. Vol. 65.

47. **PW, Jones PA and Laird.***Cancer epigenetics comes of age.* 1999. pág. 167. Vol. 21.

48. **Jaenisch R, Bird A.***Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.* 2003. págs. 245-54. Vol. 33.

49. **Ringrose, L. and Paro, R.***Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins.* 2004. págs. 413-43. Vol. 38.

50. **Hochedlinger, K. and Plath, K.***Epigenetic reprogramming and induced pluripotency.* 2009. págs. 509-523. Vol. 136.

51. **Zochbauer M, Fong K, Virmani A, Geradts J, Gazdar A, Minna J.***Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers.* 2001. págs. 249-55. Vol. 61.

52. **S, Herman J and Baylin.***Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation.* 2003. págs. 2042-2054. Vol. 349.

53. **Turek P, and Jagodzinski P.***The Role of Mammalian DNA Methyltransferases in the Regulation of Gene Expression.* 2005. págs. 631-647. Vol. 10, http://www.cmbl.org.pl.

54. **Cheng X, and Blumenthal R.***Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective.* 2008. págs. 241-250. Vol. 16.

55. **Rhee I, Jair K, Chiu Y, Lengauer C, Herman J, Kinzler K, Vogelstein B, Baylin S, Schuebel K.***CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1.* 2000. págs. 1003-7. Vol. 404.

56. **Baylin S, Esteller M, Rountree M, Bachman K, Schuebel K, Herman J.***Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer.* 2001. págs. 687-92. Vol. 10.

57. **Belinsky S, Nikula K, Palmisano W, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin S, Herman J.***Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis.* 1998. págs. 11891-6. Vol. 95.

58. **Esteller M, Sanchez M, Rosell R, Sidransky D, Baylin S, Herman J.***Cancer Res.* 1999. págs. 67-70. Vol. 59.

59. **Palmisano W, Divine K, Saccomanno G, Gilliland F, Baylin S, Herman J, Belinsky S.***Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum.* 2000. págs. 5954-8. Vol. 60.

60. **Ohta M, Inoue H, Cotticelli M, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce C, Huebner K.***The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers.* 1996. págs. 587-597. Vol. 84.

61. **Barnes L, Garrison P, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson A, Ingram S, Croce C, Ohta M, Huebner K.***Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5-prime,5-triple prime-P(1),P(3)-triphosphate hydrolase. .* 1996. págs. 11529-11535. Vol. 35.

62. **Sozzi G, Veronese M, Negrini M, Baffa R, Cotticelli M, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, Gregorio L, Pastorino U, Pierotti M, Ohta M, Huebner K and Croce C.***The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer.* 1996. págs. 17-26. Vol. 85.

63. **Shi Y, Zou M, Farid N, Paterson M.***Association of FHIT (fragile histidine triad), a candidate tumour suppressor gene, with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9.* 2000. págs. 443-448. Vol. 352.

64. **Sozzi G. Sard L, Gregorio L, Marchetti A, Musso K, Buttitta F, y cols.***Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer.* 1997. págs. 2121 – 2123. Vol. 57.

65. **Stein C, Glover T, Palmer J, Glisson B.***Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking.* 2002. págs. 333-340. Vol. 34.

66. **Kim JS, Kim H, Shim YM, Han J, Park J, Kim DH.***Aberrant methylation of the FHIT gene in chronic smokers with early stage squamous cell carcinoma of the lung.* 2004. págs. 2165-71. Vol. 25(11).

67. **Verri C, Roz L, Conte D, Liloglou T, y cols.***Fragile histidine triad gene inactivation in lung cancer: the European Early Lung Cancer project.* 2009. págs. 396-401. Vol. 179.

68. **Woenckhaus M, Merk J, Stoehr R, Schaeper F, Gaumann A, Wiebe K, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W. (2008).***Prognostic value of FHIT, CTNNB1, and MUC1 expression in non-small cell lung cancer.* págs. 126-36. Vol. 39.

69. **Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigia S, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A.***Complex structure and regulation of the p16(MTS1) locus.* 1995. págs. 2988-2994. Vol. 55.

70. **Robertson K, Jones P.***Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus.* 1999. págs. 3810-3820. Vol. 18.

71. **Kamb A, Gruis N, Weaver J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian S, Stockert E, Day R, Johnson B, Skolnick M.***A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.* 1994. págs. 436-440. Vol. 264.

72. **Liggett W, and Sidransky D.***Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer.* 1988. págs. 1197-206. Vol. 16.

73. **Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M.***Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers.* 2000. págs. 3221-9. Vol. 18.

74. **Brock V, Hooker C, Ota M, Han Y, Guo M, Ames S, Glockner S, Piantadosi S, Gabrielson E,y cols.***DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer.* 2008. págs. 1118-1128. . Vol. 358.

75. **Lerman M, and Minna J.***The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes.* 2000. págs. 6116-6133. Vol. 60.

76. **Shivakumar L, Minna J, Sakamaki J, Pestell R, White M.***The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation.* 2002. págs. 4309-4318. Vol. 22.

77. **Dammann R, Li C, Yoon J, Chin P, Bates S, Pfeifer G.***Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3.* 2000. págs. 315-319. Vol. 25.

78. **Anedchenko EA, Dmitriev AA, Krasnov GS, Kondrat'eva TT, Kopantsev EP, Vinogradova TV, Zinov'eva MV, Zborovskaia IB, Polotskiĭ BE, Sakharova OV, Kashuba VI, Zabarovskiĭ ER, Senchenko VN.***Down-regulation of RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21, RASSF1A, ITGA9, HYAL1 and HYAL2 genes in non-small cell lung cancer.* 2008. págs. 965-76. Vol. 42(6).

79. **Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, y Cols.***Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene.* 1991. págs. 589-600. Vol. 66.

80. **Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, Koyama R, Morishita T, Iwayama Y y Cols.***Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling.* 2000. págs. 1194-7. Vol. 289.

81. **Hanson, C. and Miller, J.***Non-traditional roles for the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein.* 2005. págs. 1-12. Vol. 361.

82. **Pan S, Zhang L, Gao L, Gu B, Wang F, Xu J, Shu Y, Yang D, Chen Z.***The property of methylated APC gene promotor and its influence on lung cancer cell line.* 2008.

83. **Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Wiens L, Lu H, Dong ZM, Jordan CD, Kiviat NB, Vesselle H.***DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients.* 2008. págs. 645-54. Vol. 17.

84. **Chattopadhyay N, Mitra A, Frei E, Chatterjee A.***Human cervical tumor cell (SiHa) surface alphavbeta3 integrin receptor has associated matrix metalloproteinase (MMP-2) activity.* 2001. págs. 653-658. Vol. 127.

85. **Galm O, Suzuki H, Akiyama Y, Esteller M, Brock MV, Osieka R, Baylin SB, Herman JG.***Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies.* 2005. págs. 4799–4805. Vol. 24.

86. **Gardner E, Rydberg B, Karran P, Ponder B.***Localization of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene to chromosome 10q24.33-qter.* 1991. págs. 475-476. Vol. 11.

87. **Hegi M, Diserens A, Godard S, Dietrich P, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van M, Tribolet N, Stupp R.***Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated whit temozolomide.* 2004. págs. 1871-1874. Vol. 10.

88. **Smith B, Lind G, Skotheim R, Fosså S, Fodstad , Stenwig A, Jakobsen K, Lothe R.***Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer.* 2002. págs. 8878-84. Vol. 21.

89. **Palmisano W, Divine K, Saccomanno G, Gilliland F, Baylin S, Herman J.***Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum.* 2000. págs. 5954–5958. Vol. 60.

90. **Liu Y, Lan Q, Shen M, Jin J, Mumford J, Ren D, Keohavong P.***Aberrant gene promoter methylation in sputum from individuals exposed to smoky coal emissions.* 2008. págs. 2061-6. Vol. 28.

91. **Wu JY, Wang J, Lai JC, Cheng YW, Yeh KT, Wu TC, Chen CY, Lee H.***Association of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status.* 2008. págs. 3272-7. Vol. 15(11).

92. **Carlo M. Croce, M.D.***Molecular origins of cancer: Oncogenes and Cancer.* 2008. págs. 502-11. Vol. 358.

93. **Albertson D, Collins C, McCormick F, and Gray J.***Chromosome aberrations in solid tumors.* 2003. Vol. 34.

94. **Reiter J, Threadgill D, Eley G, Strunk K, y Cols. (2001).***Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. .* 2001. págs. 1-20. Vol. 71.

95. **Wang K, Yamamoto H, Chin JR, Werb Z, Vu TH.***Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment.* 2004. págs. 53848-56. Vol. 279.

96. **Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA.***Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer..* 2007. págs. 587-95. Vol. 25.

97. **Pao W, Miller V, Zakowski M. y Cols.***EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib.* 2004. págs. 13306-11. Vol. 101.

98. **Sun S, Schiller JH, Gazdar AF.***Lung cancer in never smokers — a different disease.* 2007. págs. 778-90. Vol. 7.

99. **Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, y cols.***Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy.* 2008. págs. 3351-7. Vol. 26.

100. **Hynes, N. and MacDonald, G.***ErbB receptors and signaling pathways in cancer.* 2009. págs. 177–184. Vol. 21.

101. **Matsu H, et al.***Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients.* 2005. págs. 5007-18. Vol. 23.

102. **Gonzalez, E. and McGraw, T.***The Akt kinases.* 2009. págs. 2502-2508. Vol. 8.

103. **Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, y cols.***AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.* 1992. págs. 9267-71. Vol. 89.

104. **Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, y cols.***Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA.* 1996. págs. 3636-41. Vol. 93.

105. **Crowell JA, Steele VE.***AKT and the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway: Important Molecular Targets for Lung Cancer Prevention and Treatment.* 2003. Vol. 95.

106. **Toledo.***Patología Molecular de las neoplasias de pulmón. Rev. Esp. Patol.* 200. Vol. 33.

107. **Kim YH., Girard L., Giacomini CP., Wang P., Hernandez-Boussard, Tibshirani R., Minna JD., and Pollack JR.***Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals alteredapoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification.* 2006. págs. 130-138. Vol. 25.

108. **Land H, Parada L, and Weinberg R.***Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes.* 1983. págs. 596-602. Vol. 304.

109. **Strasser A, Harris A, Bath M, Cory S.***Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2.* 1990. págs. 331-3. Vol. 348.

110. **Soucek L, Whitfield J, Martins C, Finch A, Murphy D, Sodir N, Karnezis A, Swigart L, Nasi S, Evan G.***Modelling Myc inhibition as a cancer therapy.* 2008. págs. 679-683. Vol. 455.

111. **Takahashi E, Hori T, O'Connell P, Leppert M, White R.***Mapping of the MYC gene to band 8q24.12-q24.13 by R-banding and distal to fra(8)(q24.11), FRA8E, by fluorescence in situ hybridization.* 1991. págs. 109-111. Vol. 57.

112. **Oster S, Ho C, Soucie E, & Penn L.***The myc oncogene: MarvelouslY Complex.* 2002. págs. 81-154. Vol. 84.

113. **Leone G, Sears R, Huang E, Rempel R, Nuckolls F, Park C, Giangrande P y cols.***Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis.* 2001. págs. 105-113. Vol. 8.

114. **Nair S, Burley S.***X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA: molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors.* 2003. págs. 193-205. Vol. 112.

115. **Dominguez S, Ying C, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway D, Gu W, Gautier J, Dalla F.***Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc.* 2007. págs. 445-451. Vol. 448.

116. **Gardner L, Lee L, and Dang C.***The c-Myc Oncogenic Transcription Factor.* 2002. Vol. Second Edition.

117. **Xiaohong L, Pearsonb A, and Lunec J.***The MYCN oncoprotein as a drug development target.* 2003. págs. 125-130. Vol. 197.

118. **Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu A, Zanesi N, Callegari E, y cols.***MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases.* 2007. págs. 15805–15810. Vol. 104.

119. **Kaye F, Battey J, Nau M, Brooks B, Seifter E, De Greve J, Birrer M, Sausville E, Minna J.***Structure and expression of the human L-myc gene reveal a complex pattern of alternative mRNA processing.* 1988. págs. 186-195. Vol. 8.

120. **Theo deVos, et al.***Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer.* 2009. págs. 1337–1346. Vol. 55:7.

121. **Umetani Naoyuki, Kim Joseph , Hiramatsu Suzanne , Reber Howard , Hines Oscar , Bilchick Anton and S Dave.***Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats.* 2006. págs. 1062-1069. Vol. 52:6.

122. **Schumacher, A.***Schumacher's guide for:Bisulfite conversion of DNA for methylation fine-mapping.* 2009.

123. **Weisenberger D, Campan M, Long T, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M and Laird P.***Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight.* 2005. Vol. 33.

124. **Livak, K. and Schmittgen, T.***Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method.* 2001. págs. 402–408. Vol. 25.

125. **Biosystems., Applied.***Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.* 2004.

126. **Chen Huanga, Lin Yanga, Zhongfang Lic, Jun Yangc, Junjie Zhaoa,, Xu Dehuia, Liying Liua, Quanli Wanga, Tusheng Songa.***Detection of CCND1 amplification using laser capture microdissection coupled with real-time polymerase chain reaction in human esophageal squamous cell carcinoma.* 2007. págs. 19-25. Vol. 175.

127. **Biosystems., Applied.***Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PC.* 2004.

128. **Spira A, Beane J, Shah V, Steiling K, Liu G, Schembri F, y cols.***Airway ephitelial gene expresion in the diagnostic evalution of smokers with suspect lung cancer.* 2007. págs. 361-366. Vol. 13.

129. **Feinberg, A.***Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease.* 433-440 : s.n., 2007. Vol. 447.

130. **Cardenal, F.***ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES DE METILACIÓN EN TUMOR Y MUESTRAS NO INVASIVAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN.* Barcelona : s.n., 2005. págs. 46-52.

131. **Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, and Motoyama T.***Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers.* 2003. págs. 589-592. Vol. 94.

132. **Ekim M, Caner V, Büyükpınarbaşılı N, Tepeli E, Elmas L, Bağcı G.***Determination of O(6)-Methylguanine DNA Methyltransferase Promoter Methylation in Non-Small Cell Lung Cancer.* 2011.

133. **Hesson L, Cooper W, and Latif F.***The role of RASSF1A methylation in cancer.* 2007. págs. 73-87. Vol. 23.

134. **Irimia M, Fraga M, Sanchez M, and Esteller M.***CpG island promoter hypermethylation of the Ras-effector gene NORE1A occurs in the context of a wild-type K-ras in lung cancer.* 2004. págs. 8695-8699. Vol. 23.

135. **Maruyama R, Sugio K, Yoshino I, Maehara Y, Gazdar A.***Hypermethylation of FHIT as a Prognostic Marker in Nonsmall Cell Lung Carcinoma.* 2004. Vol. 100.

136. **Hsu H, Chen T, Hung C, Wen C, Lin R, Lee H, Wang Y.***Characterization of a Multiple Epigenetic Marker Panel for Lung Cancer Detection and Risk Assessment in Plasma.* 2007. Vol. 110.

137. **Belinsky A, Liechty K, Gentry F, Wolf H, Rogers J, Vu K, Haney J y cols.***Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Sputum Precedes Lung Cancer Incidence in a High-Risk Cohort.* 2006. Vol. 66.

138. **McGraw, Eva Gonzalez y Timothy E.***The AKT Kinases.* 2009. págs. 2502-2508. Vol. 8:16.

139. **Kentaro Nakayama, Naomi Nakayama, Robert J. Kurman, Leslie Cope, Gudrun Pohl, Yardena, et al.***Sequence Mutations and Amplification of PIK3CA and AKT2 Genesin Purified Ovarian Serous Neoplasms.* 2006. págs. 779-785. Vol. 5:7.

140. **Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, et al.***Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenecity by antisense RNA.* 1996. págs. 3636-41. Vol. 93.

141. **Piotr G. Rychahou, JungHee Kang, Pat Gulhati, Hung Q. Doan, L. Andy Chen, Shu-Yuan Xiao, Dai H. Chung, and B. Mark Evers,.***Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis.* 2008. págs. 20315-20320. Vol. 105.

142. **Wang J, Miao LJ, Wu YM, Wu YJ, Wang XC.***Expression of AKT2, cyclin d1 and MMP-9 and their correlation to clinicopathologic features of non-small cell lung cancer.* 2006. págs. 69-72. Vol. 25 (1).

143. **Roy S. Herbst, M.D., Ph.D., John V. Heymach, M.D., Ph.D., and Scott M. Lippman, M.D.***Molecular Origins of Lung Cancer.* (2008). Vol. 359; 13.

144. **Bean J, Brennan C, Shih JY, et al.***MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib.* 2007. págs. 20932-7. Vol. 104.

145. **FR Hirsch, M Varella-Garcia and F Cappuzzo.***Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer.* 2009. págs. S32-S37. Vol. 28.

146. **María C.P, Nora S.M, Ramón G.G, María H A, Emilio A. F.***Prognostic Value of ERBB2 Amplification and Protein Expression in Small Cell Lung Cancer.* 2008. págs. 122-6. Vol. 44.

147. **Canoz O, Ozkan M, Arsav V, Er O, Coskun HS, Soyuer S, et al.***The role of c-erbB-2 expression on the survival of patients with small cell lung cancer.* 2006. págs. 267-72. Vol. 184.

148. **Weiss, WC Gustafson and WA.***Myc proteins as therapeutic targets.* 2010. págs. 1249–1259. Vol. 29(9).

ANEXOS

Anexo I. CONSENTIMIENTO INFORMADO

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES Y AMPLIFICACIÓN DE ONCOGENES, COMO MARCADORES MOLECULARES EN DNA LIBRE EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR, ATENDIDOS EN CUATRO HOSPITALES DE BOGOTÁ – COLOMBIA.

La Universidad Nacional de Colombia está realizando un estudio en cáncer de pulmón. En particular, se pretende detectar los patrones de amplificación de oncogenes y estado de metilación de genes supresores tumorales en muestras de plasma sanguíneo, como también en muestras de tejido pulmonar con miras a aportar información que pueda ser útil en el diagnóstico de cáncer de pulmón.
Su colaboración es de vital importancia para nosotros, porque la investigación en la cual participa traerá consigo beneficios para la comunidad en general.
Si Ud. Tiene a gusto colaborar su participación consiste en:

1. Permitir la toma de una biopsia y una muestra de sangre, las cuales serán tomadas por personal entrenado y experto para tal fin.
2. Autorizar la revisión de su historia clínica.
3. Autorizar el procesamiento de las muestras para el estudio.

La decisión que Ud. tome es voluntaria, esto no influirá en el tratamiento que recibe.

NOMBRE DEL PACIENTE: _____
HC: _____
DIAGNOSTICO:_____
FECHA:_____

Luego de conocido el objetivo de la presente, yo _____ identificado con C.C. _____ acepto mi participación voluntaria en el estudio a realizar.

Firma_____
Fecha_____

Anexo 2. ENCUESTA A VOLUNTARIOS SANOS.

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES Y AMPLIFICACIÓN DE ONCOGENES, COMO MARCADORES MOLECULARES EN DNA LIBRE EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR, ATENDIDOS EN CUATRO HOSPITALES DE BOGOTÁ –COLOMBIA.

Las preguntas que se presentan a continuación corresponden a una información requerida para la realización de un estudio que se llevará a cabo en la Universidad Nacional. Agradecemos de antemano su colaboración.

Número de Encuesta ☐☐☐ Fecha: ☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐
dd mm aaaa

Nombres y Apellidos: _____

Teléfono residencia: ☐☐☐☐☐☐☐

Teléfono oficina: ☐☐☐☐☐☐☐ **Celular** ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

Ocupación: _____

Lugar de nacimiento: Ciudad:_____ Departamento:_____

Género: Femenino ☐ **Masculino** ☐

Edad: ☐☐

Estrato: 1 ☐ **2** ☐ **3** ☐ **4** ☐ **5** ☐ **6** ☐ **7** ☐

1. ¿Algún miembro de su familia ha presentado cáncer?

No ☐ Si ☐ NS ☐

¿Quién? _____ Qué tipo de cáncer: _____
_____ Qué tipo de cáncer: _____

2. ¿Qué alimento consume con mayor frecuencia? _____

3. ¿Con que frecuencia consume verduras?

Nunca ☐ 1 – 2 veces por semana ☐ 3 veces por semana ☐ Más de 4 veces ☐

4. ¿Con que frecuencia consume frutas?

Nunca ☐ 1 – 2 veces por semana ☐ 3 veces por semana ☐ de 4 veces ☐

5. ¿Con qué frecuencia hace ejercicio?

Nunca ☐ 1-2 veces al mes ☐ 1-2 veces a la semana ☐ os los días ☐

6. En cuanto al consumo de cigarrillo, es usted:

Fumador ☐ Cuánto tiempo lleva fumando? _____

Ex-fumador ☐ ¿Cuánto tiempo fumó?:_____ ¿Hace cuánto dejo de fumar?_____

No fumador ☐

7. ¿Con qué frecuencia fuma o fumó?

Ocasional ☐ A diario ☐ Nº de cigarrillos diarios _____

8. ¿Es o ha sido fumador pasivo?

No ☐ Si ☐

9. Si usted es fumador pasivo, ¿cuántas horas al día está expuesto al humo del cigarrillo?: _____

10. ¿Ha cocinado con leña o ha estado expuesto al humo de la leña?

No ☐ Si ☐ ¿Cuánto tiempo?_____ ¿Hace cuánto tiempo?_____

11. ¿Ha estado expuesto a alguna sustancia química en su lugar de trabajo?

No ☐ Si ☐ ¿A cuál sustancia?_____ ¿Cuánto tiempo?_____

12. ¿Ha sido usted sometido alguna cirugía?

No ☐ Si ☐ ¿A cuál?_____

13.Sufre o ha sufrido algún tipo de cáncer ?

No ☐ Si ☐ ¿Cual?_____ ¿Hace cuánto tiempo?_____

14.Sufre o ha sufrido de alguna enfermedad inflamatoria o autoinmune?

No ☐ Si ☐ ¿Cual?_____

15. ¿Ha sufrido enfermedad respiratoria aguda o alguna infección de vías respiratorias?

No ☐ Si ☐ ¿Cual?_____

16. Ha sufrido alguna de las siguientes enfermedades?

Diabetes ☐ Hipertensión ☐ Dislipidemia ☐ Asma ☐ Hepatitis ☐

Insuficiencia renal ☐ Otra? Cuál? _____

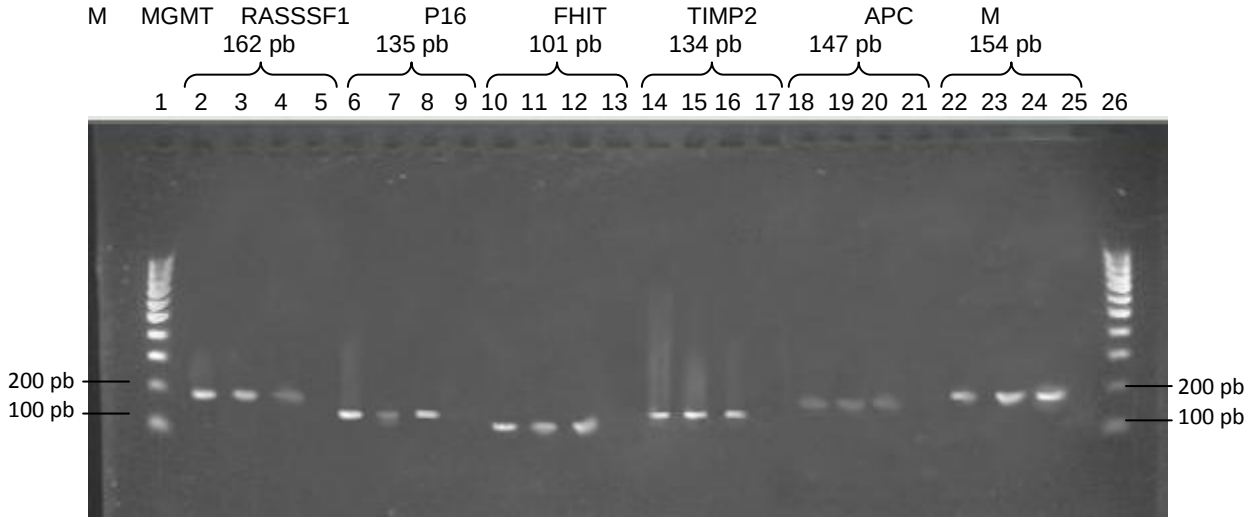
17. Consume algún medicamento

No ☐ Si ☐ ¿Cuál?_____ ¿Hace cuánto?_____

Observaciones: _____

_____

Anexo 3. CONFIRMACIÓN DEL TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR PARA LOS GENES EN LOS QUE SE EVALUÓ METILACIÓN DEL PROMOTOR.

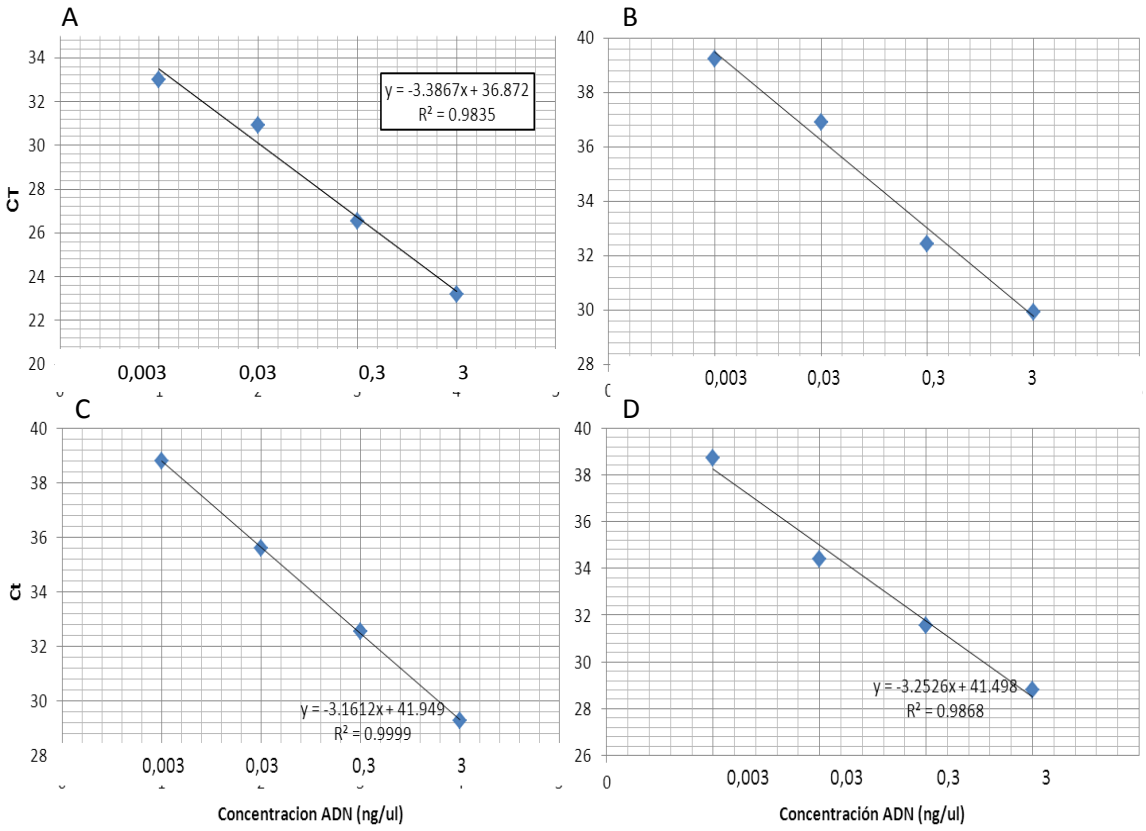


Después de realizar la MSP-PCR y observar el resultado con Syber Green, se corroboró, en algunas muestras, el tamaño del producto en geles de agarosa al 2% (anexo III).

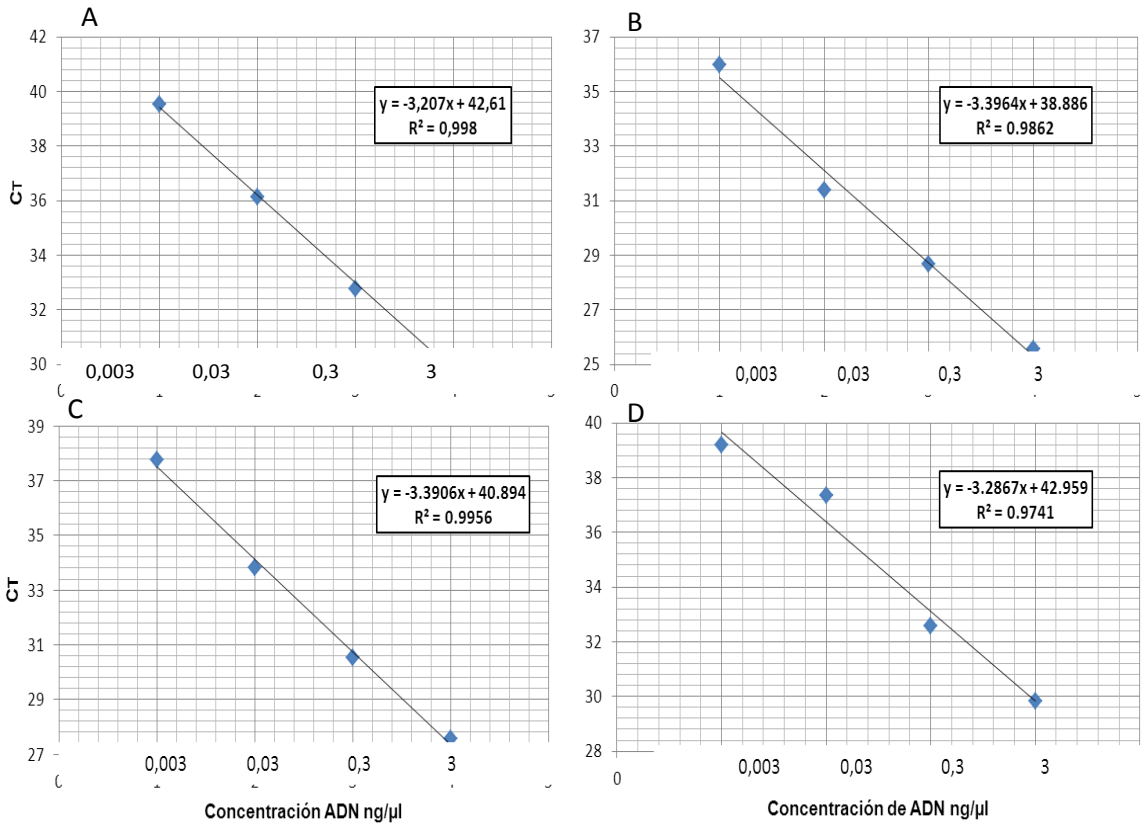
Descripción del gráfico: para cada gen, se montaron en el gel 3 muestras cuyo resultado fue positivo para metilación por Syber Green y un control negativo, así:

1	marcador de PesoHyperladder IV desde 100pb hasta 1000pb
2, 3, 4	3 muestras positivas para metilación de MGMT
5	control negativo MGMT
6, 7, 8,	3 muestras positivas para metilación de RASSF1
9	control negativo de RASSF1
10, 11, 12	3 muestras positivas para metilación de P16
13	control negativo de P16
14, 15, 16	3 muestras positivas para metilación de FHIT
17	control negativo de FHIT
18, 19, 20	3 muestras positivas para metilación de TIMP2
21	control negativo de TIMP2
22, 23, 24	3 muestras positivas para metilación de APC
25	control negativo de APC
26	3 marcador de Peso Hyperladder IV desde 100pb hasta 1000

ANEXO 4. VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE AMPLIFICACIÓN USANDO PCR MÚLTIPLEX.



Curvas estándar para el cálculo de la eficiencia de los cebadores de los genes ***A***. ACTB, ***B***. MYCN, ***C***. MYC y ***D***. MYCL1 en la reacción de PCR multiplex utilizando sondas Taqman. Los valores de eficiencia calculados fueron 2,04, 1,97, 2,03 y 2,07 respectivamente



Curvas estándar utilizada para el cálculo de la eficiencia de los cebadores de los genes ***A***. EBB2, ***B***. AKT2, ***C***. EGFR y ***D***. ACTB en la reacción de PCR multiplex utilizando sondas Taqman. Los valores de eficiencia calculados fueron 2,05, 1,96, 1,97 y 2,01 respectivamente

ANEXO 5. RESULTADOS DE METILACIÓN EN PLASMA SANGUÍNEO EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR

#	METILACIÓN PLASMAS CÁNCER											
	MGMT		FHIT		P16		APC		RASSF1		TIMP2	
	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N
1	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
2	si	no	si	no	si	no	no	si	no	si	no	si
3	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
4	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	no	no
5	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	si	no
6	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si
7	no	si	no	si	no	si	si	no	si	si	no	si
8	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
9	no	si	no	si	no	si	no	no	si	no	no	si
10	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
11	no	si	no	no	no	si	no	si	no	si	no	si
12	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
13	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
14	no	si	no	si	si	si	no	no	si	si	no	si
15	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si
16	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
17	si	si	no	si	no	si	no	no	no	si	no	si
18	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
19	si	no	si	no	no	si	si	no	si	no	no	si
20	si	no	no	si	no	si	no	no	si	no	no	si
21	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	no
22	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
23	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
24	no	no	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
25	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
26	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
27	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
28	no	no	no	si	si	no	si	no	no	si	no	si
29	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
30	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si	no	si
31	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	no
32	si	no	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
33	si	no	si	no	si	no	no	si	no	si	no	si
34	no	no	no	si	no	si	no	si	no	si	si	no
35	si	no	no	no	no	si	no	si	si	no	no	si

36	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	si	no
37	no	si	no	si	no	si	si	si	si	no	no	si
38	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
39	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
40	no	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
41	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	si	no
42	no	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
43	si	no	no	si	si	no	si	si	si	si	no	si
44	no	no	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
45	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
46	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
47	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si
48	si	no	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
49	si	no	no	no	si	no	si	si	no	si	si	si
50	no	si	no	si	no	si	no	si	no	no	si	no
51	si	No	si	no	si	no	no	si	no	si	no	si
52	no	Si	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
53	no	Si	no	si	si	no	si	no	si	no	no	si
54	si	No	no	si	si	no	no	no	no	si	si	no
55	si	No	no	no	si	no	no	si	no	si	no	si

La tabla muestra si hubo (si) o no hubo (no) amplificación, de cada gen supresor tumoral, en 55 muestras de plasma sanguíneo, provenientes de pacientes con cáncer de pulmón, utilizando cebadores que detectan la secuencia metilada (M) y no metilada (N).

ANEXO 6. RESULTADOS DE METILACIÓN EN PLASMA SANGUÍNEO DE VOLUNTARIOS SANOS

METILACIÓN PLASMAS CONTROLES												
	MGMT		FHIT		P16		APC		RASSF1A		TIMP2	
#	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N
1	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
2	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
3	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
4	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
5	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	si	si
6	si	no	no	si	si	no	si	si	no	si	no	si
7	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	no
8	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
9	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
10	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
11	no	si	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si
12	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	si	no
13	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
14	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
15	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si
16	si	no	no	si	si	no	si	si	no	si	no	si
17	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
18	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
19	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
20	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
21	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
22	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
23	no	si	no	si	si	si	si	no	no	si	si	si
24	no	si	no	si	no	si	si	si	no	si	si	si
25	no	si	no	si	si	no	si	si	no	si	no	si
26	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
27	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si
28	si	no	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si
29	no	si	no	si	si	si	no	si	si	si	no	si
30	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
31	no	si	no	si	no	si	si	si	no	si	si	si
32	si	si	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
33	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
34	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si

35	si	no	no	si	si	no	si	si	no	si	no	si
36	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
37	si	no	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
38	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
39	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
40	no	si	no	si	si	si	si	si	no	si	no	si
41	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
42	si	no	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si
43	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
44	si	no	si	no	si	si	si	no	no	si	si	si
45	si	no	si	si	si	no	no	si	no	si	no	si
46	no	si	no	si	no	si	si	si	no	si	si	si
47	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
48	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
49	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
50	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
51	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
52	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
53	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
54	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
55	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si

La tabla muestra si hubo (si) o no hubo (no) amplificación, de cada gen supresor tumoral, en 55 muestras de plasma sanguíneo, provenientes de voluntarios sanos, utilizando cebadores que detectan la secuencia metilada (M) y no metilada (N).

ANEXO 7. RESULTADOS DE METILACIÓN EN TEJIDO PULMONAR CON CÁNCER

	METILACIÓN BLOQUES CÁNCER											
	MGMT		FHIT		P16		APC		RASSF1		TIMP2	
#	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N
5	si	no	si	no	si	si	no	si	no	si	si	no
6	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
7	no	si	no	si	no	no	si	no	si	no	no	si
9	no	si	no	si	no	si	no	no	si	no	si	no
12	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
18	no	no	no	si	si	no	si	si	si	si	no	si
19	si	no	si	si	no	si	si	si	si	no	no	si
20	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	no
21	si	no	no	si	no	no	no	si	no	si	si	no
24	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
26	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
27	si	si	si	no	si	no	no	si	no	si	no	si
28	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
33	no	si	si	si	si	no	no	si	no	si	no	si
35	si	si	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si
36	no	si	no	si	no	si	no	si	no	no	no	si
41	si	si	si	no	no	si	no	si	no	si	si	no
43	no	si	si	no	si	no	no	si	si	no	no	si
44	no	si	no	si	no	si	si	si	no	si	si	no
45	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
49	si	no	no	si	no	si	si	no	no	si	si	no
51	si	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
52	no	no	no	si	si	si	no	si	si	no	no	si
53	no	si	no	si	no	si	si	no	si	no	no	si
54	no	si	si	no	si	no	no	si	no	si	si	no
55	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si

La tabla muestra si hubo (si) o no hubo (no) amplificación, de cada gen supresor tumoral, en 26 muestras de pulmón con cáncer, utilizando cebadores que detectan la secuencia metilada (M) y no metilada (N). (Se indica el número del caso #, que es el mismo de la muestra de plasma para diferenciar cuales muestras están pareadas).

ANEXO 8. RESULTADO DE METILACIÓN EN TEJIDO PULMONAR SANO

	MGMT		FHIT		P16		APC		RASSF1		TIMP2	
#	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N	M	N
1	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
2	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
3	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
4	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
5	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
6	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si
7	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
8	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
9	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
10	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
11	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
12	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
13	no	no	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
14	si	no	no	si	no	si	si	si	no	si	si	si
15	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
16	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
17	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
18	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si
19	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si
20	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
21	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
22	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
23	no	si	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si
24	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si
25	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
26	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si
27	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
28	si	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
29	no	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no	si
30	si	no	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
31	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
32	si	si	no	si	no	si	si	no	no	si	no	si
33	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
34	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si
35	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si

La tabla muestra si hubo (si) o no hubo (no) amplificación, de cada gen supresor tumoral, en 35 muestras de pulmón sano, utilizando cebadores que detectan la secuencia metilada (M) y no metilada (N).

ANEXO 9. RESULTADOS AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA PARA PLASMAS Y PULMÓN PROVENIENTE DE PACIENTES CON CÁNCER

	PLASMAS CÁNCER						BLOQUES CÁNCER					
Nº caso	MYCL1	MYCN	MYC	EGFR	ERBB2	AKT2	MYCL1	MYCN	MYC	EGFR	ERBB2	AKT2
1	0.08	0.26	0.01	0.99	6.13	1.37	39.89	44.53	0.94	3.43	4.46	3.30
2	0.38	2.04	0.24	0.90	1.25	0.40						
3	1.59	1.19	0.10	0.22	1.90	4.75						
4	1.41	0.60	1.42	0.06	0.46	3.77						
5	0.02	0.08	0.02	0.09	1.41	0.67	0.91	3.70	0.77	0.28	0.74	4.14
6	0.05	0.07	0.02	1.57	3.17	1.20	2.01	9.63	0.60	0.50	3.22	2.08
7	0.37	0.77	0.00	0.61	1.26	1.06	0.52	0.92	0.02	0.45	0.50	0.40
8	0.15	0.18	0.05	7.14	3.31	3.87						
9	0.01	0.10	0.01	0.03	0.86	4.77	0.71	1.76	0.25	0.16	0.10	10.63
10	0.45	4.92	0.18	0.45	0.95	0.99						
11	0.19	0.56	0.40	0.16	0.60	4.49						
12	0.55	0.58	28.48	2.39	2.93	59.52	5.00	1.17	0.87	2.60	14.41	253.16
13	0.00	0.02	0.91	0.81	0.33	0.27						
14	0.36	0.66	0.88	0.35	0.93	1.35						
15	0.44	0.38	2.12	1.44	0.71	11.25						
16	3.36	4.62	1.00	13.79	13.48	1.25						
17	0.15	0.12	0.32	7.62	1.42	5.26						
18	4.08	3.59	27.05	1.97	0.80	5.79	29.12	2.78	131.54	0.07	0.20	23.21
19	2.89	3.28	2.31	0.25	0.40	0.73	4.25	0.96	32.60	0.13	0.60	0.26
20	0.04	0.11	0.04	1.26	4.58	1.77	4.23	4.04	1.02	0.15	0.52	1.63
21	6.92	5.02	12.59	0.28	1.17	5.24	7.19	14.94	3.14	7.20	17.79	72.69
22	3.19	3.05	1.19	0.03	0.15	3.30						
23	2.80	3.48	0.01	0.21	0.21	0.66						
24	0.00	0.02	0.02	1.77	5.26	6.69	0.28	0.20	2.86	0.42	10.12	17.43
25	0.02	0.06	0.02	1.28	1.98	1.44						
26	3.42	1.01	9.64	0.32	1.29	1.16	4.21	0.51	4.59	0.07	0.00	0.28
27	3.02	4.78	0.57	0.27	0.25	0.60	8.25	3.41	26.68	0.82	0.13	0.74
28	5.26	7.54	0.09	1.77	2.96	1.72	2.75	7.29	0.89	0.01	0.02	0.48
29	0.17	1.11	0.35	8.53	2.11	1.00						
30	0.29	0.52	0.04	1.54	4.39	2.13						
31	11.77	10.52	9.76	0.18	0.64	0.69						
32	1.17	1.76	0.09	1.11	1.49	0.67						

33	0.14	0.56	1.54	0.34	0.99	2.36	1.18	2.30	1.43	0.28	1.67	11.92
34	0.08	0.26	0.60	0.64	0.31	10.31						
35	0.18	0.05	3.27	1.20	0.23	3.35	25.95	0.94	3.63	0.06	0.67	14.61
36	0.32	0.90	1.93	0.12	0.67	2.51	2.05	1.02	0.20	0.67	0.66	10.18
37	3.20	4.36	0.85	0.22	0.21	0.01						
38	269.21	472.17	110.54	2.14	3.04	10.93						
39	0.42	0.34	0.22	0.32	0.17	0.18						
40	0.92	0.96	7.10	0.22	0.22	97.58						
41	0.21	0.72	3.48	0.66	0.40	0.78	89.22	36.84	60.94	0.03	0.33	5.60
42	0.55	4.80	39.78	0.29	0.52	0.16						
43	0.32	0.11	0.47	0.29	0.12	1.68	0.32	0.27	0.65	0.38	0.28	1.96
44	0.27	0.49	0.11	0.54	0.83	0.19	0.08	0.19	0.72	0.16	0.00	0.01
45	0.23	1.34	4.59	2.32	1.73	4.64	0.25	0.74	9.01	0.25	0.24	4.08
46	45.60	24.52	7.49	0.23	0.33	3.51						
47	0.70	0.42	1.02	0.10	0.06	0.87						
48	0.16	0.29	0.27	0.89	0.86	0.30						
49	0.44	3.13	2261.08	0.26	0.50	1.03	50.49	17.39	9.88	0.43	1.03	2.99
50	1.55	1.29	0.31	2.50	1.38	5.55						
51	0.68	0.64	0.37	0.14	0.30	1.30	0.76	0.77	0.23	0.11	0.02	3.12
52	1.32	0.38	1.83	0.12	0.41	3.13	0.98	0.93	1.31	1.02	0.42	9.76
53	1.44	0.48	0.20	0.37	0.97	0.93	0.16	0.06	5.22	0.19	0.21	22.19
54	1.61	0.69	2598.57	0.05	0.40	74.01	48.68	0.09	165.42	0.00	0.01	43.02
55	1.25	0.82	3924.14	0.21	0.53	2.75	0.01	0.08	99.27	0.39	0.57	27.20

La tabla muestra el valor de doble delta CT obtenido para cada muestra de plasma y tejido pulmonar con cáncer, y se presentan en rosado los valores mayores a 2, consideradas como muestras amplificadas. (las muestras que están pareadas están organizadas en la misma fila)

ANEXO 10. RESULTADOS AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA OBTENIDOS DE PLASMAS PROVENIENTES DE VOLUNTARIOS SANOS

	PLASMAS NORMALES					
Nºcaso	MYCL	MYCN	MYC	EGFR	ERBB2	AKT2
1N	0.24	0.32	1.03	1.83	0.20	0.02
2N	0.13	0.39	0.18	0.21	0.20	0.18
3N	0.41	0.63	0.16	13.91	1.61	0.89
4N	0.50	0.23	1.28	0.98	0.91	0.31
5N	1.09	1.57	1.00	0.14	0.20	0.37
6N	0.22	0.66	0.09	0.67	1.88	0.44
7N	0.72	1.44	0.74	0.16	0.21	0.92
8N	0.15	0.29	1.62	0.18	0.03	0.32
9N	4.20	0.86	0.54	0.39	0.32	1.50
10N	0.30	0.08	0.07	0.12	0.19	0.16
11N	0.85	0.01	0.05	0.01	0.02	0.09
12N	0.03	1.99	1.67	0.83	0.92	0.31
13N	0.12	1.75	1.68	3.15	0.27	0.07
14N	1.90	1.18	1.25	1.34	1.66	2.46
15N	0.06	0.57	0.40	0.09	0.26	0.73
16N	1.73	1.04	3.49	1.02	0.44	0.11
17N	0.29	0.06	0.25	1.24	1.34	0.54
18N	1.30	1.08	0.02	0.47	0.75	4.81
19N	0.00	0.34	0.30	0.21	0.29	0.36
20N	0.04	0.08	0.04	1.00	0.98	0.44
21N	0.52	0.37	0.07	0.04	0.09	0.06
22N	1.52	0.80	3.34	0.56	0.48	0.18
23N	0.93	0.30	1.72	0.96	1.01	1.33
24N	0.36	1.98	0.48	0.53	0.19	1.23
25N	2.18	0.08	0.29	0.50	0.99	1.43
26N	0.64	0.06	0.03	0.48	1.35	2.67
27N	0.20	0.12	0.93	0.37	0.43	0.37
28N	0.00	0.05	0.63	1.77	1.68	0.33
29N	0.23	2.06	1.05	0.42	0.06	0.73
30N	1.34	0.78	1.74	0.58	1.41	0.57
31N	1.37	1.02	0.62	1.47	1.25	0.79
32N	1.31	1.66	0.18	0.29	0.54	0.76
33N	1.47	2.18	4.71	1.08	1.99	0.16
34N	0.55	0.96	1.50	1.46	0.10	0.02
35N	1.17	1.16	0.88	0.18	0.17	1.82

36N	0.41	0.28	0.17	0.47	0.39	0.66
37N	0.34	0.09	0.29	0.13	0.20	0.26
38N	0.57	0.56	0.49	0.97	0.15	0.02
39N	0.09	0.99	0.11	0.19	1.10	0.17
40N	0.13	0.13	0.13	0.42	0.30	0.05
41N	0.79	1.49	0.26	0.52	1.11	1.72
42N	0.16	0.09	0.06	1.04	0.30	1.18
43N	1.43	1.50	0.04	0.92	0.54	0.20
44N	0.34	0.51	0.11	0.55	0.73	0.11
45N	0.23	0.06	0.27	0.04	0.25	0.50
46N	0.23	0.48	0.32	1.72	1.17	0.16
47N	1.27	0.32	0.19	0.08	0.20	4.41
48N	0.20	0.16	0.18	1.14	0.53	0.22
49N	0.20	0.39	0.12	0.41	0.43	0.59
50N	0.05	0.19	0.34	0.44	0.67	1.94
51N	0.37	0.45	0.26	0.57	0.85	0.41
52N	0.61	1.08	0.25	0.29	0.72	0.78
53N	0.95	0.31	1.72	0.06	0.51	0.53
54N	0.68	0.45	0.70	0.27	0.73	0.60
55N	0.39	0.17	1.30	0.11	0.80	0.75

La tabla muestra el valor de doble delta CT obtenido para cada muestra de plasma proveniente de voluntarios sanos, se presentan en rosado los valores mayores a 2, consideradas como muestras amplificadas.

ANEXO 11. RESULTADOS AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA OBTENIDOS ENTEJIDO PULMONAR NORMAL.

	BLOQUES CONTROLES					
nº CASO	MYCL	MYCN	MYC	EGFR	ERBB2	AKT
1	1.16	0.24	0.20	0.09	0.36	0.57
2	29.40	0.96	0.34	0.38	0.48	0.02
3	2.47	1.56	0.01	0.34	0.49	1.26
4	1.28	0.04	0.01	0.44	0.27	1.21
5	0.28	0.59	0.03	0.04	0.05	0.06
6	0.00	0.06	0.02	0.31	0.26	0.02
7	0.11	0.42	0.08	0.68	0.87	0.23
8	1.61	0.23	0.95	1.32	0.70	0.52
9	0.18	0.27	0.21	0.65	0.20	0.26
11	2.60	1.60	0.30	7.20	3.30	1.90
12	0.13	0.35	0.10	1.59	1.04	0.34
13	0.08	0.26	0.27	0.17	0.14	0.56
14	0.76	1.84	0.44	0.05	0.07	0.12
15	0.38	0.14	0.03	3.22	0.29	0.37
16	1.38	0.35	0.02	1.37	0.02	0.08
17	0.52	0.09	0.26	0.48	0.19	0.91
18	0.57	0.01	0.48	1.38	0.68	0.30
19	0.07	0.08	0.35	0.09	0.03	0.21
20	0.14	0.58	0.26	0.45	1.16	0.50
21	0.28	0.27	1.41	0.64	2.85	0.50
22	0.36	0.92	0.20	1.28	2.02	0.26
23	0.03	0.14	0.87	0.04	0.23	0.01
24	0.08	0.12	0.22	0.20	0.13	0.02
25	0.28	0.12	0.10	0.91	1.02	3.11
26	1.35	0.02	1.77	0.29	0.11	0.57
27	0.06	0.30	1.96	1.89	0.12	0.16
28	0.08	0.16	1.39	0.33	0.13	0.09
29	1.20	4.49	1.00	0.07	0.69	0.08
30	1.76	0.81	1.57	0.53	1.33	0.02
31	0.58	0.75	1.04	0.05	1.73	0.13
32	1.17	0.99	0.50	0.73	1.77	1.94
33	0.31	0.17	0.30	0.09	0.23	0.62
34	0.17	0.25	0.47	0.42	0.54	1.67
35	0.81	1.02	0.87	1.55	1.96	1.61
36	0.56	0.35	0.45	0.96	1.40	0.65

La tabla muestra el valor de doble delta CT obtenido para cada muestra de tejido pulmonar sano, se presentan en rosado los valores mayores a 2, consideradas como muestras amplificadas.