



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Determinación del grado de exposición al humo del tabaco y su asociación con factores de predisposición para el desarrollo de cáncer de pulmón”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Química Clínica

Presenta

Q.F.B. Alejandra Guadalupe Alcázar Ramos

Dirigido por:

Dra. Karla Isabel Lira De León

Co-dirigido por:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dra. Karla Isabel Lira De León  
Presidente

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos  
Secretario

M. en C. David Gustavo García Gutiérrez  
Vocal

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote  
Suplente

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Diciembre 2019  
México

## Dedicatoria

*Este trabajo fue inspirado por la historia de seres que he encontrado en lucha a lo largo de mi vida. El mensaje entre cada una de las líneas escritas está dedicado a su duelo.*

*Con todo mi amor a:*

*Flor de María Bonifaz Monterrosa*

*Fernando Antonio Ramos Bonifaz*

*Roberto Ramos Bonifaz*

*Beatriz Guadalupe Ramos Bonifaz*

*Graciela Leticia Bonifaz Monterrosa*

*Y a aquellas personas que han luchado en silencio.*

*Oyes lo que jamás quisiste oír,  
y de golpe, se alejan las paredes,  
se aleja la vida, se acaba el mañana  
y una luz cegadora lo llena todo.*

*Notas como va llegando el miedo  
y un gélido escalofrío se adueña de ti;  
todo se agolpa, se mezcla dentro,  
se agolpan las preguntas,  
huyen como humo las respuestas,  
se mezcla el “no puede ser” con la verdad,  
se marchan la ilusión y el futuro,  
no llegan a ti las palabras de consuelo,  
no notas las manos que te agarran.*

*De golpe te has quedado solo  
con tus pensamientos más negros,  
a mil kilómetros de todo y de todos  
masticando tú desgracia.*

*¿Dónde estás esperanza? ¿Callas?  
has huido de mí de repente,  
te has convertido en polvo  
que mis lágrimas han arrastrado,  
te ha desterrado el miedo  
que has visto dibujado en mi rostro,  
te ha asustado el dolor  
y me has dejado solo, sin consuelo.*

*Sin ti, es oscura la imagen  
que me devuelve cruel el espejo,  
y en el negro de mis pupilas  
se adivina un silencioso vacío.*



*Tienes cáncer – Ramón Merino*

## **Agradecimientos**

A **Dios**, por darme salud y la bendición de despertar cada día con ganas de continuar incluso cuando me he olvidado de la meta.

A **mi familia**, por siempre estar para mí y tener las palabras correctas en el momento adecuado, ¡qué bendición tan grande!

A **nuestro equipo de investigación**, que a pesar de largas horas de trabajo permanecieron constantes hasta lograr la meta del día a día.

A **mis sinodales, directores y maestros** por ser ejemplo, por la paciencia y tolerancia a cada tropiezo a lo largo de este trabajo. Gracias por permitirme aprender constantemente de cada uno de ustedes.

A la **Dra. Karla Isabel Lira De León**, por compartir momentos que me enseñaron a fortalecer mi propio concepto de “equipo”, por darme cada oportunidad de crecer y adquirir nuevas experiencias.

A **mi equipo dentro del Hospital General de Querétaro – ISSSTE**, conformado por médicos, enfermeras, administrativos, químicos y pacientes, a quienes considero pieza fundamental en este proyecto.

Al **Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** por la oportunidad de convivir y aprender detalladamente de grandes mentes y personajes del instituto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la motivación económica que permitió generar experiencias invaluable a lo largo de esta trayectoria académica.

A la **Maestría en Química Clínica Diagnóstica de la Universidad Autónoma de Querétaro** y sus integrantes por permitirme ser parte de su historia.

## Índice general

<b>Dedicatoria</b>	<b>1</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>3</b>
<b>Índice general</b>	<b>4</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>6</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>7</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>8</b>
<b>Resumen</b>	<b>10</b>
<b>Summary</b>	<b>11</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>12</b>
<b>2 Antecedentes</b>	<b>14</b>
2.1 Cáncer	14
2.1.1 Definición	14
2.1.2 Factores de predisposición para el cáncer	15
2.1.3 Oncogénesis	15
2.1.4 Protooncogenes	18
2.2 Cáncer pulmonar	20
2.2.1 Estadificación	24
2.2.2 Métodos diagnósticos y de estadificación	26
2.3 Tabaquismo	29
2.4 Biomarcadores para determinar la exposición al humo del tabaco	32
2.5 Formación de aductos de ADN – Benzopireno diol epóxido (BPDE)	35
2.6 Metilación de ADN	42
<b>3 Hipótesis</b>	<b>48</b>
<b>4 Objetivos</b>	<b>49</b>
4.1 General	49
4.2 Particulares	49

<b>5</b>	<b>Metodología</b>	<b>50</b>
5.1	Diseño	50
5.1.1	Definición del Universo	50
5.1.2	Tamaño de muestra	50
5.1.3	Definición de las unidades de observación	51
5.1.4	Grupo control	51
5.1.5	Criterios de inclusión	51
5.1.6	Criterios de exclusión	52
5.1.7	Criterios de eliminación	52
5.1.8	Definición de variables y unidades de medida	53
5.1.9	Fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información	53
5.2	Procedimientos	55
5.2.2	Determinación de la concentración de cotinina sérica	55
5.2.3	Extracción de ADN	57
5.2.4	Cuantificación de ADN.	58
5.2.5	Determinación de la integridad de ADN	58
5.2.6	Determinación del porcentaje de metilación global de ADN	59
<b>6</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>64</b>
6.1	Características de la población	64
6.2	Resultados obtenidos por grupo	69
6.3	Correlación entre concentraciones de cotinina sérica y el porcentaje de metilación global de ADN	77
6.4	Correlación entre la edad y el porcentaje de metilación global de ADN	79
<b>7</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Referencias</b>	<b>83</b>
	<b>Anexo 1: Convenio entre el hospital general del ISSSTE y la Universidad Autónoma de Querétaro</b>	<b>99</b>
	<b>Anexo 2: Consentimiento informado</b>	<b>100</b>
	<b>Anexo 3: Cuestionario de tabaquismo</b>	<b>107</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de pulmón.	25
Tabla 2. Zonas ganglionares propuestas y estaciones que abarcan.	26
Tabla 3. Definición de unidades de observación.	51
Tabla 4. Características de la variable.	53
Tabla 5. Diluciones para la curva de estandarización del porcentaje de metilación.	60
Tabla 6. Características del grupo de no fumadores.	69
Tabla 7. Características del grupo de fumadores pasivos.	70
Tabla 8. Características del grupo de fumadores activos.	71
Tabla 9. Características del grupo de pacientes con cáncer pulmonar.	72

## Índice de figuras

Figura 1. Cascadas de señalización de p53.	17
Figura 2. Mecanismos de activación de un proto-oncogén.	19
Figura 3. Zona de conducción y respiratoria del aparato respiratorio.	20
Figura 4. Alveolos pulmonares y estructuras relacionadas.	23
Figura 5. Vía metabólica de nicotina en humanos.	33
Figura 6. Activación del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos.	38
Figura 7. Metilación de ADN y silenciamiento de genes.	46
Figura 8. Curva de calibración de cotinina.	57
Figura 9. Curva de calibración del porcentaje de metilación global de ADN.	62
Figura 10. Conformación de los grupos de estudio.	64
Figura 11. Exposición al humo del tabaco según el género.	66
Figura 12. Comparaciones de la edad entre los grupos de estudio.	68
Figura 13. comparación de cotinina sérica entre grupos de estudio.	73
Figura 14. Comparación del porcentaje de metilación global de ADN entre grupos de estudio.	74
Figura 15. Correlación de metilación con cotinina sérica por grupo.	78
Figura 16. Correlación entre la edad y el porcentaje de metilación global de ADN por grupo.	80



## Abreviaturas

### Abreviaciones

A	Fumador activo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHRR	Represor del receptor de hidrocarburos aromáticos
ARN	Ácido ribonucleico
ARH	Receptor de hidrocarburo aromático
ARNT	Translocador nuclear de receptor de hidrocarburo aromático
BPDE	Epóxido de benzo (a) pirenodiol
C	Paciente con cáncer pulmonar
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CME	Enzimas metabolizantes de carcinógenos
CPM	Cáncer de pulmón microcítico
CPNM	Cáncer pulmonar no microcítico
CYP1A1	Gen P450 de la familia 1, subfamilia A y alelo 1
CYP17	Gen P450 de la familia 17
CYP2A6	Gen P450 de la familia 2, subfamilia A y alelo 6
CYP2D6	Gen P450 de la familia 2, subfamilia D y alelo 6
CYP2C19	Gen P450 de la familia 2, subfamilia C y alelo 19
CYP 450	Citocromo P 450
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DNAmTL	Metilación de ADN en la longitud de telomeros
EBUS	Ultrasonografía endoscópica respiratoria
EDTA	Etilen diamino tetra acético
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EROD	Etoxiresorufina-O-desetilasa
EUS	Ultrasonográfica endoscópica digestiva
FMO3	Favina monooxigenasa 3
FPR	Factor promotor de la replicación
GST	Glutación s-transferasa
GSTM1	Glutacion s-transferasa mu 1
HDAC	Histona desacetilasa
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HGFR	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
HIF	Factor inducido por hipoxia
HPA	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IEAA	Aceleración epigenética intrínseca de la edad
LINE	Elementos nucleares largos intercalados
MAT	Metionina addenosiltransferasa

<i>MDM</i>	Gen regulador negativo del p53
<i>MED</i>	Mediastinoscopia
<i>MEDCE</i>	Mediastinoscopia cervical extendida
<i>MEDTM</i>	Mediastinotomía
<i>MSK1</i>	Serin/treonin quinasa
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
<i>NF</i>	No fumador
<i>NLS</i>	Señal de localización nuclear
<i>NQO1</i>	Quinona oxidorreductasa
<i>P</i>	Fumador pasivo
<i>PAAF</i>	Punción aspirativa con aguja fina
<i>PET</i>	Tomografía de emisión de positrones
<i>PRMT6</i>	Proteína arginin metiltransferasa 6
<i>PUFA</i>	Ácidos grasos poliinsaturados
<i>qRT-PCR</i>	Reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa cuantitativa
<i>RT-PCR</i>	Reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa
<i>SAH</i>	S-adenosil-homocisteína
<i>SAM</i>	S-adenosilmetionina
<i>TAE</i>	Tris acetato EDTA
<i>TBNA</i>	Punción transbronquial a ciegas
<i>TC</i>	Tomografía computarizada de tórax
<i>TCDD</i>	Tetracloro dibnzo-p-dioxina
<i>TEMLA</i>	Linfadenectomía mediastínica transcervical extendida
<i>TFH</i>	Tetrahidrofolato
<i>VAMLA</i>	Linfadenectomía mediastínica asistida por video
<i>5-mC</i>	5-metilcitosina

## Resumen

El tabaquismo es una enfermedad causada por la adicción a la nicotina, por su naturaleza se reconoce como la primera causa de muerte prevenible a nivel mundial. En México, la prevalencia de consumo fue de 20.1% en población de 18 a 65 años, mientras que en el estado de Querétaro la prevalencia del consumo de tabaco en adultos del mismo rango de edad fue de 21.5%. Además, el tabaquismo se asocia con enfermedades como: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares y cáncer de pulmón, siendo este último el que más incidencia tiene en relación con el consumo del tabaco, ya que el 87% de los casos de cáncer de pulmón y el 82% de las muertes por enfermedad pulmonar se deben al consumo del tabaco. El objetivo de la presente tesis fue cuantificar el grado de exposición al humo del tabaco en individuos no fumadores (n=10), fumadores pasivos (n= 7), fumadores activos (n= 9) y pacientes con cáncer pulmonar (n= 4), mediante la evaluación de cotinina sérica que es comúnmente usado como biomonitor de la exposición a nicotina y el porcentaje de metilación global de ADN que está siendo utilizado en investigación como probable biomarcador de cáncer; ambas basadas en el método de ELISA. En nuestro análisis obtuvimos los niveles promedio de cotinina sérica: 1.24, 1.45, 3.70 y 0.45 ng/mL en no fumadores, fumadores pasivos, fumadores activos y pacientes con cáncer de pulmón no fumadores, respectivamente. Los promedios en el porcentaje de metilación global de ADN de los mismos grupos fueron de comportamiento descendente, obteniendo 3.31, 2.49, 1.95, 1.58%, respectivamente. Se concluyó que no existe correlación entre los niveles de cotinina sérica y el porcentaje de metilación global de ADN, sin embargo, en el caso particular de este último, se observó que del 22.2% de fumadores activos es menor al 1% al igual que el 50% de los pacientes con cáncer pulmonar.

Palabras clave: Cáncer pulmonar, biomarcadores, tabaquismo.

## Summary

Smoking is a disease caused by nicotine addiction, by its nature it is recognized as the leading cause of preventable death worldwide. In Mexico, the prevalence of consumption was 20.1% in the population aged 18 to 65, while in the state of Querétaro the prevalence of tobacco use in adults of the same age range was 21.5%. In addition, smoking is associated with diseases such as: chronic obstructive pulmonary disease, cardiovascular diseases, cerebrovascular diseases and lung cancer, the latter being the one with the highest incidence in relation to tobacco consumption, since 87% of cases of Lung cancer and 82% of deaths from lung disease are due to smoking. The objective of this thesis was to quantify the degree of exposure to tobacco smoke in non-smoking individuals (n = 10), passive smokers (n = 7), active smokers (n = 9) and patients with lung cancer (n = 4), by assessing serum cotinine that is commonly used as a biomonitor of nicotine exposure and the percentage of global DNA methylation that is being used in research as a probable cancer biomarker; both based on the ELISA method. In our analysis we obtained serum cotinine levels which were directly proportional to exposure to tobacco smoke, obtaining the following averages: 1.24, 1.45, 3.70 and 0.45 ng / mL in non-smokers, passive smokers, active smokers and cancer patients of non-smoking lungs, respectively. The averages in the percentage of global DNA methylation of the same groups were of descending behavior, obtaining 3.31, 2.49, 1.95, 1.58%, respectively. It was concluded that there is no correlation between serum cotinine levels and the percentage of global DNA methylation, however, in the particular case of the latter, it was observed that 22.2% of active smokers is less than 1% as well as 50% of patients with lung cancer.

Keywords: Lung cancer, biomarkers, smoking.

## 1 Introducción

A nivel mundial, el 63% de las muertes anuales son ocasionadas por enfermedades no transmisibles, destacando entre ellas las enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes y cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2015d, p. 201, 2013). De los distintos tipos de cáncer, en los varones el desarrollo de cáncer de pulmón, próstata y colorrectal son los de mayor prevalencia, mientras que en las mujeres son el cáncer de mama, colorrectal, seguido del pulmonar (Organización Mundial de la Salud, 2015a, 2014).

En México, de acuerdo con los resultados de un estudio descriptivo sobre la tendencia de mortalidad por cáncer del periodo de 1990 a 2012, se determinó que la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón y bronquios en mayores de 20 años, es mayor en la zona norte, seguida por la zona central y sur del país (Rizo, González, Sánchez, & Murguía, 2015). La prevalencia de consumo de tabaco en población mexicana de 18 a 65 años, fue de 20.1%, mientras que en el estado de Querétaro la prevalencia del tabaquismo en adultos del mismo rango de edad fue de 21.5%, la cual está por encima del valor a nivel nacional (Escobar et al., 2018), sumando a esto la afectación a terceros ya que, las personas que inhalan dichos tóxicos de manera pasiva también son altamente afectadas, incluso pueden llegar a presentar cáncer pulmonar (Liras, Martín, García, Maté, & Padilla, 2007). Del 100% de las personas que asisten a bares, el 52% se encuentra expuesta al humo del tabaco como fumadores pasivos; en los restaurantes es el 31.9%, en el transporte público el 26%, en las escuelas el 25.4%, en el área de trabajo el 15.2% y en el mismo hogar el 14.1% también son expuestos (Escobar et al., 2018).

A pesar de que se han tomado medidas preventivas en lugares públicos para disminuir la incidencia de cáncer de pulmón tanto en fumadores activos como en pasivos, esta continúa, dado a que el cáncer pulmonar en estadios tempranos es asintomático, lo que provoca que los pacientes acudan a revisión luego de presentar síntomas como tos, disnea, disfonía, hemoptisis y dolor torácico,

característicos de estadios avanzados como IIIB o IV, lo cual implica una sobrevida de aproximadamente 5 años (Amorín Kajatt, 2013).

Actualmente, el diagnóstico de cáncer pulmonar se realiza mediante técnicas específicas muy útiles para el diagnóstico, el seguimiento del tratamiento y definición del estadio, pero poco útiles para el diagnóstico preventivo. Estudios tanto en el área de la biología molecular y genética, como en los radiológicos y los nuevos exámenes de imágenes (como la broncoscopia con autofluorescencia o la navegación electromagnética), harán posible detectar displasias, cáncer *in situ*, tumores micronodulares pulmonares menores de 10 mm o menores de 2 cm (T1a), así también se considera que la tomografía helicoidal de dosis bajas, los estudios moleculares y los biomarcadores séricos pueden ser empleados para este fin (Amorín Kajatt, 2013; «Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening», 2011).

Específicamente para este caso, se considera de importancia aquellos biomarcadores séricos que apoyen en la cuantificación de la exposición al humo del tabaco, dentro de los cuales, la cotinina es el biomarcador más destacado y utilizado desde un ángulo científico dada a las propiedades del metabolismo de la nicotina y del tiempo de eliminación del metabolito. Aunado a esto, desde el ángulo molecular, se han realizado diferentes evaluaciones tanto genéticas como epigenéticas, dentro de las cuales destaca la metilación y su relación con la carcinogénesis y la edad. Ya que el cáncer de pulmón está estrechamente relacionado con la edad, la medición del porcentaje de metilación global de ADN se ha estimado como un biomarcador aplicable para medidas preventivas y/o de diagnóstico para cáncer de pulmón tanto causado por tabaquismo como en no fumadores (Gazdar & Zhou, 2018; Kulis & Esteller, 2010), por lo cual, el objetivo de este proyecto es cuantificar el grado de exposición al humo del tabaco en individuos no fumadores, fumadores pasivos, fumadores activos y pacientes con cáncer pulmonar y determinar los factores asociados en el desarrollo de cáncer de pulmón.

## 2 Antecedentes

### 2.1 Cáncer

#### 2.1.1 Definición

Según la OMS, el cáncer:

*“Es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana”* (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Se ha determinado que el cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de mutaciones en la secuencia del ADN y a nivel epigenético, es decir, alteraciones en genes que no cambian la información (secuencia) contenida en el material genético, pero que modulan la expresión génica a través de modificaciones específicas relacionadas con la remodelación de la cromatina mediada por modificaciones químicas de las histonas y del ADN, por ejemplo en genes que codifican la lisina metil transferasa (MLL1) o las serin/treonin quinasas (MSK1) que metilan y fosforilan al ADN correspondientemente (Macías Sánchez, Zazueta-Novoa, Mendoza-Macías, Rangel-Serrano, & Padilla-Vaca, 2008; Villar, 2009). Por esta razón, la citogenética se ha especializado en la identificación de los cambios numéricos y estructurales de los cromosomas en distintas neoplasias humanas, logrando la identificación de numerosas alteraciones cromosómicas en linfomas, tumores sólidos y blandos, tanto malignos como benignos (Araujo, Fernández, García, & Sánchez, 2015).

### 2.1.2 Factores de predisposición para el cáncer

El cáncer en general es detonado por factores inevitables como el envejecimiento, inmunosupresión, luz solar, radiación, exposición a algunas sustancias químicas, hormonas, herencia, virus, etc. (Grossman & Porth, 2014a), así como la interacción de comorbilidades, es decir, la presencia de otras patologías de distinta etiología, también aumenta el riesgo de padecer cáncer entre las personas de edad avanzada dado a que las sintomatologías entre estas tienden a ser confundidas (Bustamante, Marin, & Cardona Arango, 2012). Y factores prevenibles como el alcohol, la dieta y el tabaco, que intervienen alterando el ciclo celular (Instituto Nacional de Cáncer, 2015).

Los factores genético-moleculares van en relación con el equilibrio entre la actividad metabólica y la capacidad de detoxificación de los carcinógenos contenidos en el humo del tabaco, estos determinan el riesgo individual o de predisposición para desarrollar cáncer en general. Los derivados del metabolismo de los carcinógenos afectan al ADN uniéndose covalentemente de forma irreversible, permitiendo la formación de aductos de ADN cuya concentración es directamente proporcional al número de cigarrillos fumados, el cual es un índice de riesgo cancerígeno en fumadores. Cuando se deja de fumar, dicha concentración tiende a disminuir si los mecanismos de la reparación del ADN aún funcionan adecuadamente, en caso de no hacerlo, la célula es conducida a los mecanismos de apoptosis o muerte celular; o desafortunadamente, por la inadecuada reparación del ADN no llega a la muerte celular, por lo que el ADN dañado mantiene su síntesis normalmente pero, los productos ahora son erróneos, esto desemboca en un cambio celular fatal, dándole otras propiedades a la célula (Liras et al., 2007).

### 2.1.3 Oncogénesis

El ciclo celular está conformado por dos fases: la M y la interfase. En la primera se encuentra la mitosis y la citocinesis, donde se lleva a cabo la división celular; mientras que la interfase es un intervalo donde la célula crece y efectúa diversas



actividades metabólicas, que se preparan para la mitosis próxima, que a su vez se divide en tres etapas: G1, S y G2. En G1 la célula crece, los organelos se duplican y esta mantiene su metabolismo normal con síntesis activa de ARN y proteínas, en la fase S es equivalente al periodo de síntesis del ADN, es decir, se realiza la duplicación del ADN, se sintetizan las histonas necesarias, así como las enzimas necesarias para la siguiente fase, mientras que, en la G2, la célula aumenta de tamaño y se prepara para entrar a la fase M sintetizando el ARN y las proteínas necesarias para la mitosis (Grossman & Porth, 2014b). Las células que han dejado de dividirse de forma temporal o permanente se encuentran en una etapa previa al inicio de síntesis del ADN llamando esto la fase G0. La duración de los ciclos celulares varía desde 30 min hasta varios meses según las propiedades del tejido, como el hígado de los mamíferos (Karp, 2011b).

El correcto funcionamiento del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos dentro de los que destacan las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y su complejo correspondiente (CDK-ciclinas), este se encarga de dirigir a la célula de una fase a otra del ciclo celular. Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de dicho complejo inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige. El complejo CDK-ciclinas también puede ser inhibido por otras proteínas como p16 y p21 que bloquean la actividad de la cdk2, evitando formar el factor promotor de la replicación (FPR) ya que nunca se activa la proteína pKB, por ende, no hay progresión del ciclo en G1; en el caso de p21 depende de p53 y esta se activa cuando las células tienen daño en el ADN y en el caso de p16, inhibe la actividad de CDK4-D1 1 (Ver figura 1) (Peralta-Zaragoza, Bahena-Román, Díaz-Benítez, & Madrid-Marina, 1997).

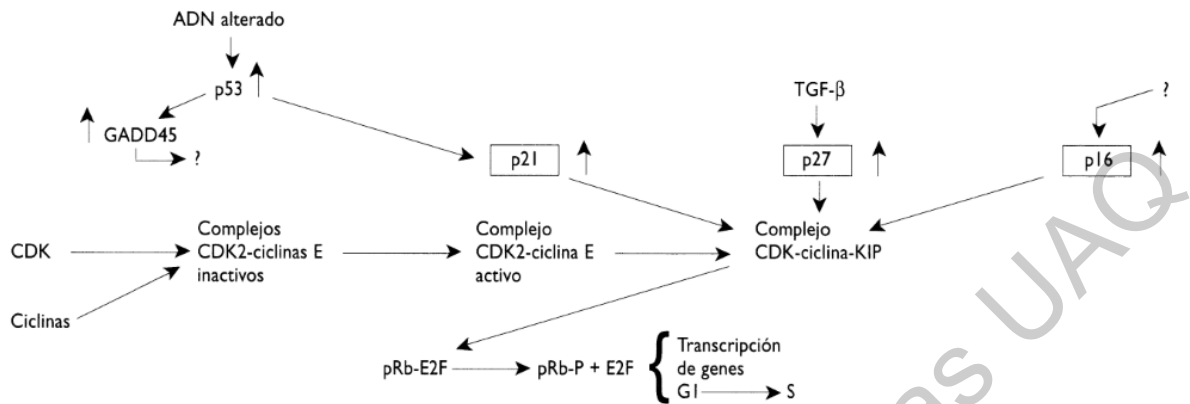


Figura 1. Cascadas de señalización de p53 (*Peralta-Zaragoza et al., 1997*).

Para que el proceso oncogénico se lleve a cabo, deberán suceder alteraciones en seis funciones esenciales de la fisiología celular (Karp, 2011b):

- Autosuficiencia para gobernar las señales de crecimiento (donde tienen una misión preponderante los proto-oncogenes).
- Insensibilidad hacia las señales inhibitorias del crecimiento celular (mediada especialmente por los genes supresores de tumor).
- Evasión de la muerte celular (apoptosis).
- Potencial replicativo ilimitado.
- Fomento sostenido de angiogénesis.
- Alteraciones en la adhesividad celular que proporcionarían capacidad para la invasión tisular y el desarrollo de metástasis.

Dichas alteraciones tienen lugar en una célula que presenta cambios genéticos los cuales determinan la modificación de la expresión de proteínas implicadas en la replicación celular, destacándose los grupos de proto-oncogenes que condicionan la aparición de oncogenes, que codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y la conversión de una célula a su estado maligno, de los cuales, la mayoría, actúan como aceleradores de la proliferación celular, y los genes supresores del tumor, que desempeñan justo el papel opuesto, es decir,

actúan como frenos celulares que codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y previene la mutación maligna de las células, estos generalmente conducen a la célula en un estado quiescente (G0) en una situación postmitótica tras su diferenciación pero su alteración suele ser un acontecimiento tardío cuando se trata del proceso oncogénico, lo que condiciona que el proceso de replicación celular estimulado por los oncogenes, no se detenga (Galofré, Calleja, Panizo, & Salvador, 2002; Karp, 2011b).

#### 2.1.4 Protooncogenes

Los protooncogenes (gen que codifica proteínas que intervienen en el crecimiento y diferenciación celular, los cuales puede derivar a oncogén por mutaciones) pueden activarse por diferentes mecanismos como se muestra en la figura 2 (Karp, 2011a):

- El gen puede mutar de tal manera que altere las propiedades del producto génico para que ya no funcione de forma normal, ya sea por una delección o inserción de una base que sea capaz de modificar el codón y traducir a un aminoácido erróneo y este cambie la propiedad de la proteína.
- El gen puede duplicarse una o más veces, lo que produce la amplificación y producción excesiva de la proteína codificada.
- Puede haber un reordenamiento cromosómico dado a la traslocación de una secuencia reguladora posicionada en un sitio específico que actúe sobre el gen ubicado en 3' y aumente la síntesis de la proteína correspondiente o que un gen codificador sea traslocado sobre la secuencia de otro gen, formando un gen de fusión sintetizando proteínas erróneas. En dichas translocaciones, el rearrreglo cromosómico implica también la reubicación de un oncogén que suele pasar de un sitio en donde se encuentra reprimido a otro de transcripción y síntesis activa; esto explica la amplificación de las secuencias oncogénicas.

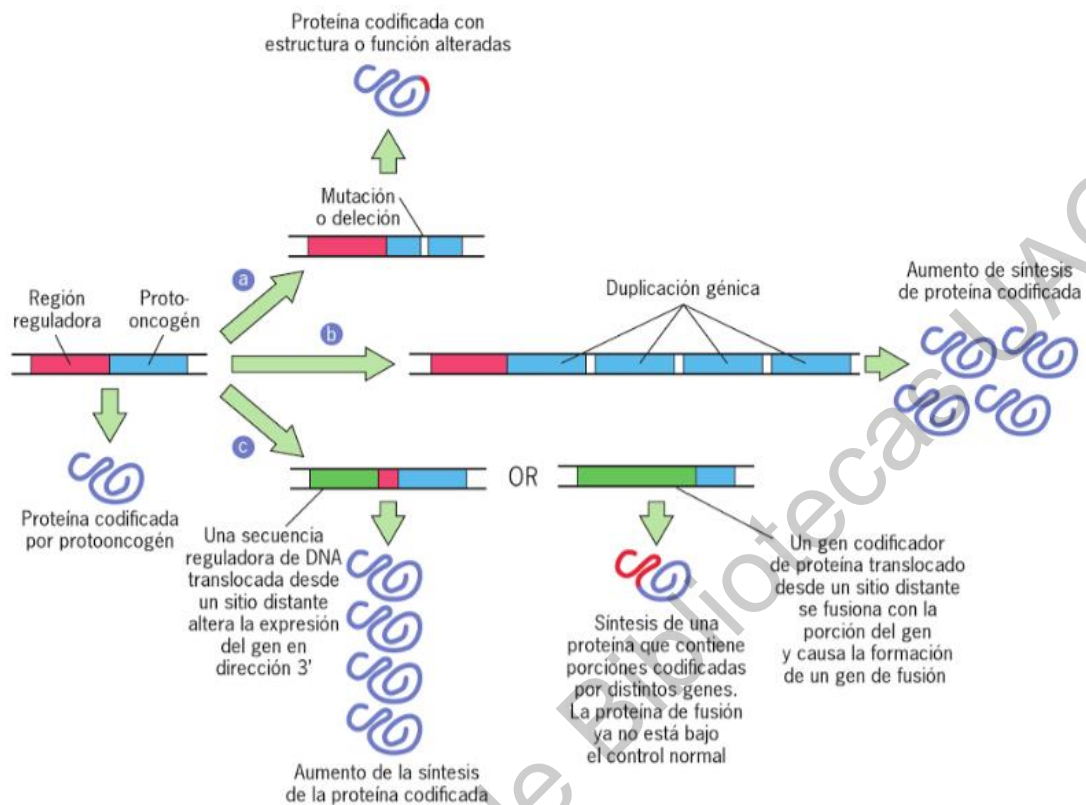


Figura 2. Mecanismos de activación de un proto-oncogén (Karp, 2011a).

Las alteraciones causadas por dichas mutaciones en el ADN afectan, dentro de algunos ejemplos, a la proteína p53 proveniente de un gen supresor de tumores, que está involucrada en el control del ciclo celular, la síntesis de ADN, su reparación, diferenciación celular, en la transcripción génica y en la muerte programada de las células, por otro lado, existe la activación de oncogenes con la capacidad de inhibir a los genes supresores de tumores, a la unión de estos mecanismos se les conoce como efecto cancerígeno potenciador o efecto sinérgico de la combinación de distintas mutaciones en diferentes genes con respecto al riesgo de desarrollar cáncer (Grossman & Porth, 2014b). De la misma manera se han descrito efectos combinados de mutaciones en distintos genes como p73 (relacionado con la angiogénesis), EGFR (codifica el receptor para el factor de

crecimiento epidérmico), MDM (gen regulador negativo del p53), HGF y HGFR (codifican el factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor), k-ras (que participa en las vías de señalización celular que controlan el crecimiento y la apoptosis), HSP90 (codifica la proteína de choque térmico hsp90, involucrada en el plegamiento, ensamblaje, maduración y estabilización de proteínas fundamentales para la supervivencia de células tumorales de pulmón) (Liras et al., 2007).

## 2.2 Cáncer pulmonar

La anatomía del aparato respiratorio se puede clasificar de acuerdo con su función o a su estructura; según la primera, se clasifica en la zona de conducción y en la zona respiratoria (Ver figura 3) (Fox, 2014).

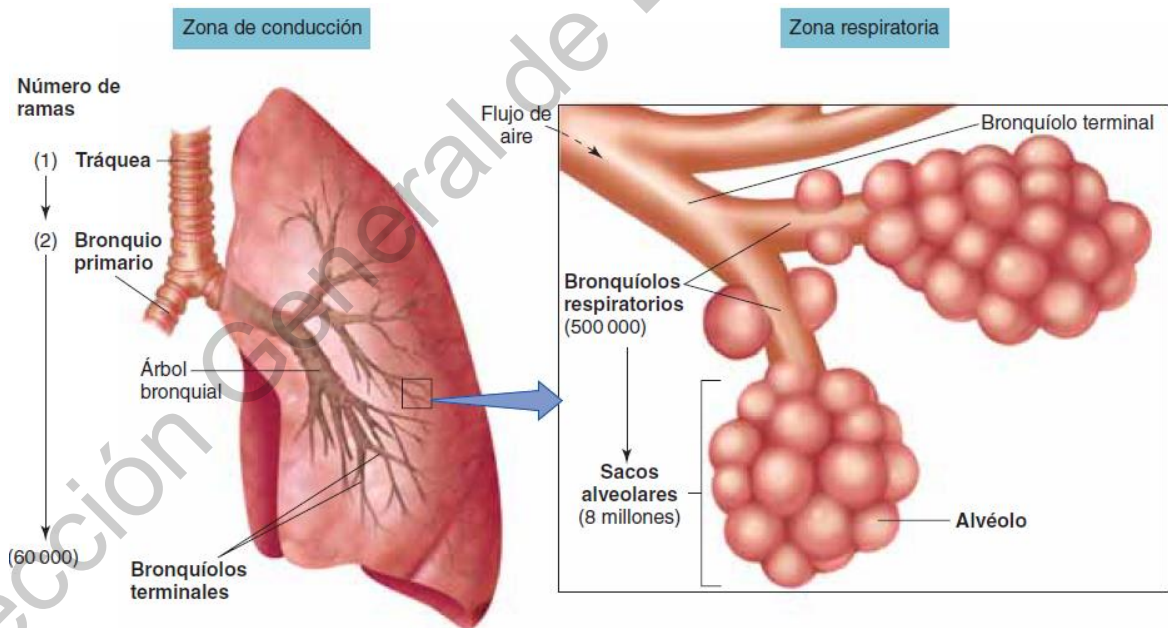


Figura 3. Zona de conducción y respiratoria del aparato respiratorio (Fox, 2014).

Por otro lado, su clasificación según su estructura se divide en aparato respiratorio superior e inferior; el superior abarca la nariz, la faringe y las estructuras

asociadas. El aparato respiratorio inferior contiene la laringe, la tráquea, los bronquios y los pulmones. Por medio del conjunto de estas estructuras y canales, se lleva a cabo la ventilación pulmonar que consta de 3 pasos: 1) la ventilación pulmonar, que es la inspiración y la expiración de aire entre atmósfera y los alveolos pulmonares; 2) respiración externa, donde se lleva a cabo el intercambio de gases entre los alveolos pulmonares y la sangre en los capilares pulmonares en la membrana respiratoria, donde la sangre gana  $O_2$  y pierde  $CO_2$ ; 3) respiración interna, donde el intercambio de gases entre la sangre en los capilares sistémicos y las células tisulares, donde la sangre pierde  $O_2$  y gana  $CO_2$  (Tortora, Grabowski, Werneck, Esbérard, & Passos, 2002). Dichas estructuras y funciones tienden a estar comprometidas cuando el organismo se ve en constante exposición a carcinógenos, de las cuales el árbol bronquial es el más afectado en el cáncer pulmonar, el cual también es conocido como carcinoma broncogénico, este se origina en el epitelio de los conductos bronquiales. Los tumores broncogénicos se denominan de acuerdo con el lugar de su origen, por ejemplo, los adenocarcinomas se desarrollan en las zonas periféricas de los pulmones a partir de las glándulas bronquiales y las células alveolares, los carcinomas de células escamosas se desarrollan del epitelio de los conductos bronquiales más grandes y los carcinomas de células pequeñas se desarrollan a parte de las células epiteliales de los bronquios primarios cerca del hilio del pulmón y tienden a comprometer el mediastino tempranamente. Según el tipo de tumor broncogénico, puede ser agresivo, invasivo localmente y dar metástasis generalizadas. Los tumores comienzan como lesiones epiteliales que luego crecen para formar masas que obstruyen los conductos bronquiales o invaden tejido pulmonar adyacente. Los carcinomas broncogénicos producen metástasis en los ganglios linfáticos, el cerebro, los huesos, el hígado y otros órganos (Tortora et al., 2002).

Los síntomas del cáncer de pulmón están relacionados con la localización del tumor. Pueden consistir en tos crónica, hemoptisis, sibilancias, disnea, dolor torácico, ronquera, dificultad para tragar, pérdida de peso, anorexia, fatiga, dolores

óseos, confusión, trastornos del equilibrio, dolor de cabeza, anemia, trombocitopenia e ictericia (Tortora et al., 2002).

Los procesos antes mencionados, tienden a afectar de diversas formas al tejido pulmonar, las zonas donde se forman las primeras aberraciones y la caracterización de estas, para esto, debemos saber que los pulmones son órganos pares con capacidad de extensión, rodeados de membranas (pleura parietal y pleura visceral) que facilitan el movimiento de respiración con ayuda del líquido pleural. Los pulmones son divididos en lóbulos (3 en el derecho: superior, medio e inferior; y 2 en el izquierdo: superior e inferior), dentro de estos se encuentra el árbol bronquial que es ramificado hasta llegar a los alveolos (ver figura 4), los cuales están compuestos por células diferentes, dentro de los alveolos se lleva a cabo el intercambio de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ) por difusión a través de la membrana respiratoria, ésta es compuesta por cuatro capas: 1) la pared alveolar (células alveolares de tipo I y II y macrófagos alveolares), 2) la membrana basal epitelial, 3) membrana basal capilar y 4) el endotelio capilar. Los pulmones al nacer son de color rosa, pero con la edad se torna un color grisáceo debido a la acumulación de partículas de polvo de carbón inhaladas, lo cual es más notable en población urbana y en fumadores (Tortora et al., 2002).

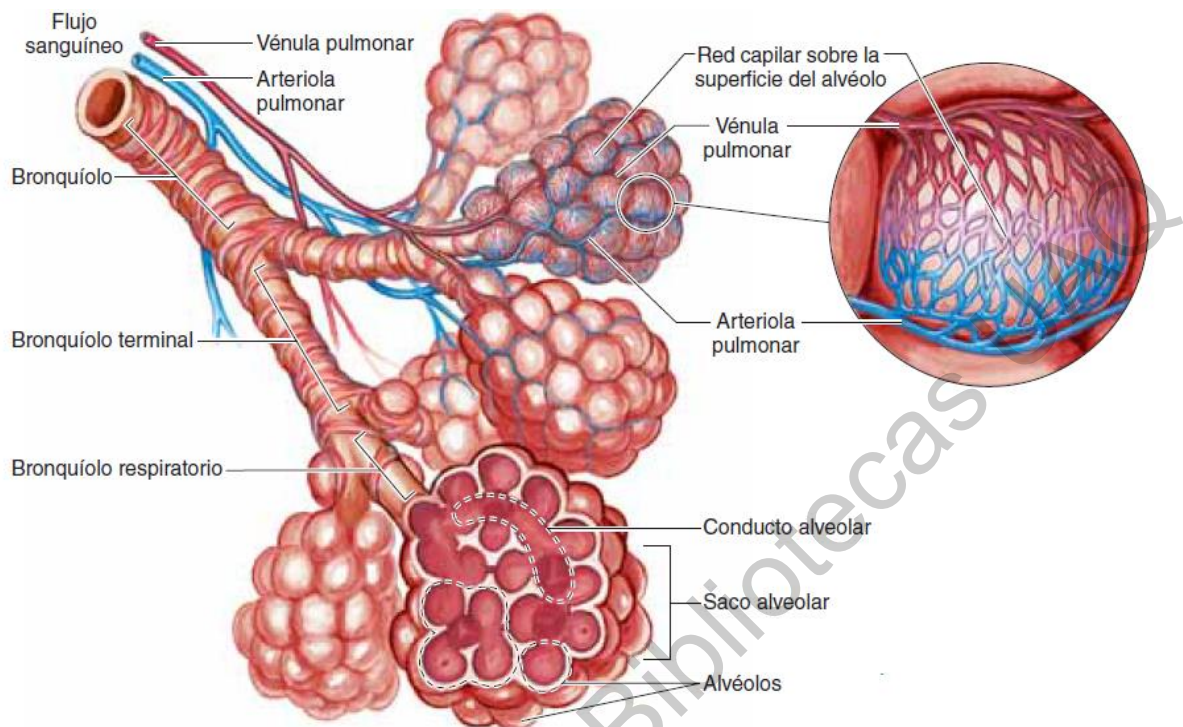


Figura 4. Alveolos pulmonares y estructuras relacionadas (Fox, 2014).

De acuerdo con la caracterización de las células carcinógenas, el cáncer de pulmón es agrupado en cuatro categorías: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma microcítico, pero solamente en el 34% de los casos aparecen neoplasias histológicamente puras, el resto demuestra distintas variaciones, casi siempre se encuentran carcinomas epidermoides junto con adenocarcinomas. Por otro lado, en la práctica, el carcinoma epidermoide o de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes, se unen dentro de un grupo llamado carcinoma de pulmón de células no pequeñas o carcinoma de células grandes, para distinguirlo del carcinoma de células pequeñas, que juntos forman el 90 – 95% de los tumores pulmonares. El tratamiento de primera elección para el carcinoma microcítico, es la quimioterapia, mientras que, para el carcinoma de células no pequeñas, en estadios iniciales, el tratamiento es quirúrgico debido a que es poco sensible a la



quimioterapia y radioterapia (Gómez-de-Terreros, F. J. & Alvarez-Sala-Walther, R., 2000; Muñoz & Pérez, 2007).

El cáncer de pulmón microcítico (CPM), presenta características específicas como: Un índice de replicación muy elevado, un rápido crecimiento tumoral, una diseminación sistémica precoz y tiene una respuesta inicial al tratamiento de quimioterapia satisfactoria, aunque la mayoría de los pacientes normalmente fallecen por recidiva de su enfermedad ya que 2/3 de los pacientes presentan metástasis detectables fuera del tórax. Se detectó que el tabaco provoca sobre el epitelio bronquial del CPM mayor daño genético que sobre el de cáncer pulmonar no microcítico (CPNM), y produce en él mínimos cambios morfológicos preneoplásicos (Casado, 2008).

### 2.2.1 Estadificación

El estadio clínico del cáncer de pulmón permite cuantificar la agresión de la enfermedad, el intercambio de información, la elegibilidad quirúrgica, diseñar el tratamiento, valorar resultados al término del tratamiento y el seguimiento de la enfermedad; se considerará a partir del diagnóstico citohistológico (Amorín Kajatt, 2013). La clasificación TNM fue determinada por la Asociación Internacional para el Estudio de Cáncer de Pulmón (IASLC, por sus siglas en inglés) donde describe la extensión del cáncer en el cuerpo de un paciente y clasifica según el tamaño del tumor y las regiones linfáticas afectadas como se muestra en la tabla 1. Según un estudio, el componente "N" está estrechamente relacionado con el tiempo de supervivencia, es decir, entre más afectación ganglionar, menor es el tiempo de supervivencia. La supervivencia a 5 años de acuerdo con la estadificación clínica y patológica respectivamente fueron: IA (50 y 73%), IB (43 y 58%), IIA (36 y 46%), IIB (25 y 36%), IIIA (19 y 24%), IIIB (7 y 9%) y IV (2 y 13%) (de Cos et al., 2011).

Las nuevas técnicas de estudios por imágenes, aspectos moleculares, genéticos del cáncer, nuevas corrientes terapéuticas, entre otros, han sido incluidas en los criterios de la nueva clasificación TNM (Amorín Kajatt, 2013).

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de pulmón (Amorín Kajatt, 2013).

	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
T1 ( $\leq 2$ cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1 ( $> 2$ cm $\leq 3$ cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 ( $> 3$ cm $\leq 5$ cm)	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2 ( $> 5$ cm $< 7$ cm)	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2 ( $\geq 7$ cm)	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3 (Invasión directa)	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3 (Nódulos en el mismo lóbulo)	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (extensión)	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
T4 (Nódulos ipsilaterales)	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a (efusión pleural)	IV	IV	IV	IV
M1a (nódulos contralaterales)	IV	IV	IV	IV
M1b (metástasis a distancia)	IV	IV	IV	IV

El Comité Internacional de Estadificación (CIE) propuso la agrupación de estaciones ganglionares en zonas con la finalidad de facilitar la descripción de la afectación ganglionar y estudiarlas de forma prospectiva de la manera siguiente (ver tabla 2) (Rami Porta, 2009):

Tabla 2. Zonas ganglionares propuestas y estaciones que abarcan (*Rami Porta, 2009*).

Zona	Estaciones ganglionares
Zona superior	Mediastínica más alta
	Paratraqueal superior
	Prevascular y retrotraqueal
	Paratraqueal inferior
Zona aortopulmonar	Subaórtica (ventana aortopulmonar)
	Paraaórtica (aorta ascendente o nervio frénico)
Zona subcarínica	Subcarínica
Zona inferior	Paraesofágica
	Ligamento pulmonar
Zona hilar	Hiliar
	Interlobular
Zona periférica	Lobular
	Segmentaria
	Subsegmentaria

### 2.2.2 Métodos diagnósticos y de estadificación

#### a) Procedimientos de estadificación no invasivos:

- Radiografía de tórax: a menudo reflejan la invasión de estructuras anatómicas adyacentes al pulmón que suelen contraindicar un tratamiento quirúrgico; puede ser decisiva para determinar el grado de invasión y simplificar el proceso de estadificación (de Cos et al., 2011).
- Tomografía computarizada de tórax (TC): Con respecto al tumor primario, permite obtener información detallada del tamaño, localización, relaciones anatómicas con estructuras vecinas y puede detectar nódulos de muy pequeño tamaño que no son detectables con la radiografía de tórax; este

estudio es una representación bidimensional de un corte seccional tridimensional, compuesta por pixeles y voxeles (Mejía-Ávila, Mayra Edith et al., 2016).

- Tomografía de emisión de positrones (PET): basada en la mayor actividad metabólica de las células neoplásicas, aporta información sobre la biología tumoral, pero tiene menor resolución espacial que la TC, pero en la evaluación del mediastino, PET es más eficaz que TC, destacando que también tiene una elevada sensibilidad para detectar metástasis a distancia (de Cos et al., 2011).

b) Procedimientos de estadificación invasivos no quirúrgicos (de Cos et al., 2011; Mejía-Ávila, Mayra Edith et al., 2016):

- Punción transbronquial a ciegas (TBNA): La eficacia diagnóstica solo se aproxima a la punción orientada por ecografía en la estación subcarínica, en el resto su rendimiento es inferior (58% vs 84%).
- Ultrasonografía endoscópica respiratoria (EBUS): tiene alta precisión diagnóstica para la estadificación ganglionar mediastínica, incluso en ganglios menores a 1 cm.
- Ultrasonografía endoscópica digestiva (EUS): Este método, acoplado a la punción aspirativa con aguja fina (EUS-PAAF) permite además detectar metástasis subdiafragmática, así como valorar la presencia de invasión mediastínica por parte del tumor, con mucha más precisión que las técnicas radiológicas.
- Exploración ultrasonográfica mediastínica global: la combinación de EBUS-PAAF y EUS-PAAF permite un acceso complementario a todas las estaciones ganglionares mediastínicas, a excepción del lóbulo superior izquierdo.

c) Procedimientos de estadificación mediante técnicas quirúrgicas (de Cos et al., 2011):

- Mediastinoscopia (MED): permite explorar las estaciones ganglionares paratraqueales tanto derecha como izquierda, superiores como inferiores y la estación subcarínica. El requerimiento mínimo aceptable es la biopsia de al menos 1 ganglio de dichas estaciones (Mejía-Ávila, Mayra Edith et al., 2016).
- Mediastinotomía (MEDTM) y la mediastinoscopia cervical extendida (MEDCE) dan acceso a las estaciones ganglionares subaórtica y paraaórtica.
- Videotoracoscopia: permite una exploración completa de la cavidad pleural y del mediastino ipsilateral, sino hay adherencias pleurales que lo impidan, pero normalmente permite el acceso a las estaciones ganglionares paratraqueales inferiores derechas e hiliares, subcarínica, paraesofágicas y del ligamento pulmonar inferior en ambos lados, así como las estaciones subaórtica y paraaórtica en el lado izquierdo. El inconveniente principal es que es una exploración unilateral, lo que, para la exploración completa, se requiere de la observación de ambos hemitórax.
- La linfadenectomía mediastínica asistida por video (VAMLA) y la linfadenectomía mediastínica transcervical extendida (TEMLA) son variantes de la linfadenectomía mediastínica por video que son equivalentes a la disección ganglionar mediastínica realizada por toracotomía, pero más sensible.

d) Estadificación molecular:

La estadificación molecular se refiere a la determinación de biomarcadores en el tejido linfático como indicador de presencias neoplásicas; la detección y cuantificación de ARNm que se encarga de codificar proteínas propias del tumor o de la misma célula epitelial, puede llevarse a cabo mediante la RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), también se pueden analizar mutaciones

específicas o alteraciones epigenéticas tumorales en el ADN extraído del ganglio linfático (de Cos et al., 2011).

En México, los métodos diagnósticos más usados son: citología de esputo, lavado bronquial, cepillado bronquial, biopsias obtenidas por broncoscopia, biopsia por aspiración con aguja fina y biopsia quirúrgica (Gurrola-Díaz, González-Santiago, Troyo-Sanromán, & Mendoza-Topete, 2009).

Luego de un diagnóstico, pacientes en etapa I y II con cáncer pulmonar de tipo CNM se tratan con resección quirúrgica recomendando quimioterapia complementaria la cual se personaliza de acuerdo a las características del tumor localizado; en el caso de los enfermos en etapa IIIA tienen resultados finales desfavorables cuando únicamente son tratados con resección, por lo que a partir de aquí deben referirse a protocolos de múltiples modalidades que incluyan tanto quimioterapias como radioterapias para mejorar la supervivencia, incluso pacientes en etapa IIIB en los que además de resección, tienen tratamiento de múltiples modalidades, pueden llegar a curarse. Finalmente, los pacientes en etapa IV reciben tratamiento con quimioterapias o medidas paliativas con base en los síntomas. En el caso del carcinoma microcítico, se dan buenos pronósticos de respuesta a la quimioterapia; sin embargo, cuando el cáncer reaparece, la respuesta a los fármacos desciende con una estrecha relación en la extensión de la enfermedad, esta patología es la que más incidencia tiene en relación con el consumo del tabaco, ya que el 87% de los casos de cáncer de pulmón y el 82% de las muertes por enfermedad pulmonar se deben al consumo del tabaco (Grossman & Porth, 2014b; Tortora et al., 2002).

### **2.3 Tabaquismo**

El consumo de tabaco se ha practicado desde siglos atrás, dependiendo de la región y la época, éste se ha relacionado con rituales, ceremonias de tratos, como tratamiento a diferentes enfermedades o heridas, hasta llegar al concepto de

hoy en día, usado como diversión o estatus social, esto provocó que se generaran industrias tabacaleras que, como resultado, potencializó el consumo en distintas regiones del mundo. Posteriormente con el aumento de estudios a las enfermedades, se detectó en la década de los 50's y 60's que el consumo del tabaco estaba estrechamente relacionado con enfermedades como la bronquitis, el enfisema, cáncer pulmonar y de otros órganos, entre otras, por lo que desde ese entonces se ha luchado constantemente con el tabaquismo, obteniendo pocos resultados a favor (Sabido, Cicero, & Fernández, 2003).

El tabaco está compuesto por más de 4,000 componentes, dependiendo de las características como el sabor, el olor, entre otras (Mejía-Ávila, Mayra Edith et al., 2016), dentro de todos los componentes que contiene el tabaco en sus distintas variedades, 60 son carcinógenos, los que se dividen en: hidrocarburos aromáticos, N nitrosaminas, aminas aromáticas y componentes inorgánicos, dichos componentes tiene la capacidad de introducirse a la célula y formar aductos de ADN, cuyos errores son resueltos por los genes supresores de tumores, pero dado a la alta exposición a estas sustancias, dichos aductos de ADN suelen ser acumulativos hasta generar mutaciones en los genes relacionados con el ciclo celular, también llamados oncogenes, causando el inicio de la oncogénesis (Acuña & Román, 2013; Franco Tobón & Ramírez Botero, 2013; Vázquez-Gómez, Rubio-Lightbourn, & Espinosa-Aguirre, 2016).

Por lo anterior, se calcula que el tabaquismo se relaciona con un 20% de las muertes por diferentes tipos de cáncer a nivel mundial, por esto se considera la principal causa prevenible de cáncer en el mundo, mientras que específicamente en el cáncer de pulmón se encuentra relacionado con un 70% como única causa (Organización Mundial de la Salud, 2014); sin embargo, esta patología también es atribuible a la exposición ocupacional a sustancias carcinógenas (como asbesto, níquel, cromo), alcoholismo y antecedentes de enfermedades respiratorias obstructivas crónicas (Acosta Reynoso, Remón Rodríguez, Segura Peña, Ramírez Ramírez, & Carralero Rivas, 2016). A nivel mundial, 1.3 billones de personas fuman,

existiendo una relación entre la tasa de incidencia (62/100000) de cáncer pulmonar proporcional a la prevalencia del consumo (Acuña & Román, 2013).

Se han identificado las características relacionadas entre el consumo de tabaco y el cáncer pulmonar, estas son (Acuña & Román, 2013):

- Inicio: Entre más joven se inicie el tabaquismo, más temprana podría darse la aparición de cáncer pulmonar.
- Manera de consumo: el filtro reduce del 20% – 40% la incidencia con respecto a aquellos que lo consumen sin filtro.
- Duración/intensidad del consumo: El riesgo se vuelve exponencial con la duración (mes/año) aunado con la intensidad (10,20,>20 cigarrillos/día) de consumo, el cual es de tipo lineal.

El estudio clásico de la Sociedad Americana del Cáncer que describe estas tendencias es el Estudio de prevención de cáncer II que menciona lo siguiente: 1 cajetilla/día/30 años equivale a 20 – 60 veces más probabilidad de padecer cáncer pulmonar frente a aquellos que no lo consumen.

También son importantes las características del cigarro que se ingiere (como el tipo de filtro, compuestos mentolados, cantidad de nicotina, etc.) ya que éstas tienden a aumentar la interacción entre los elementos tóxicos del tabaco y el organismo del fumador, tal es el caso de los cigarrillos light cuyo contenido de nicotina es menor, pero al presentar menor cantidad de nicotina provoca que el fumador consuma mayor cantidad de cigarrillos para nivelar el efecto deseado, incluso, el fumador hace inhalaciones más profundas, causando que el agente tóxico llegue a zonas más distales donde se desarrolla el cáncer, incluso han favorecido una localización periférica de adenocarcinomas en contraste con la localización focalizada de cánceres escamosos (Liras et al., 2007).

Fumar puede hacer que una persona quede fácilmente sin aliento aún durante el ejercicio moderado debido a diversos factores que disminuyen la eficiencia respiratoria en los fumadores (Tortora et al., 2002):



- 1) La nicotina contrae los bronquiolos terminales, lo cual disminuye el flujo aéreo que entra y sale de los pulmones.
- 2) El monóxido de carbono en el humo se une a la hemoglobina y reduce su capacidad de transporte de oxígeno.
- 3) Los irritantes del humo provocan un aumento de la secreción por las mucosas del árbol bronquial y la inflamación del revestimiento mucoso, lo cual impide el flujo aéreo de entrada y salida de los pulmones.
- 4) Los irritantes del humo también inhiben el movimiento ciliar y destruyen los cilios del epitelio y revestimiento del sistema respiratorio.
- 5) Con el tiempo, el hábito de fumar lleva a la destrucción de las fibras elásticas en los bronquiolos y es la causa principal del enfisema, estos cambios causan el colapso de los bronquiolos y el atrapamiento aéreo en los alveolos al final de la espiración, cuyo resultado es el intercambio gaseoso menos eficiente.

Se han aprovechado las propiedades de cada molécula que permanecen después de ser metabolizadas con el fin de determinar el grado de exposición al humo del tabaco definiéndolos como biomarcadores.

#### **2.4 Biomarcadores para determinar la exposición al humo del tabaco**

Con el objetivo de evaluar el estado de un fumador y de este modo poder medir la exposición al humo del tabaco incluso pasivamente, se aprovecha el metabolismo de dichas sustancias dentro del organismo. En este sentido, se destacan el uso de diferentes métodos como el del monóxido de carbono en el aire espirado (tiempo de vida media de 2 a 5 horas), tiocianato (tiempo de vida media de 10 a 14 días) y con menor frecuencia, la carboxihemoglobina (tiempo de vida media variable), la nicotina (tiempo de vida media de 2 horas) y su principal metabolito: la cotinina (tiempo de vida media de 19 horas) (Becoña, 2010).

El biomarcador más utilizado de la ingesta de nicotina es la cotinina, que puede medirse en sangre, orina, saliva, cabello o uñas. La cotinina se obtiene luego de

metabolizar la nicotina por CYP2A6 en el hígado para después ser eliminada por la orina (ver figura 5) (Benowitz, St Helen, Dempsey, Jacob III, & Tyndale, 2016; Nakajima & Yokoi, 2005). El punto de corte óptimo actual de la cotinina plasmática para distinguir a los fumadores activos de los no fumadores en la población general de EE. UU. es de 3 ng/mL (Benowitz, Hukkanen, & Jacob, 2009). Mientras que para el caso de los fumadores pasivos se han identificado valores entre 0.31 y 1.99 ng/mL (Jarvis, Feyerabend, Bryant, Hedges, & Primatesta, 2001). Sin embargo, el metabolismo de la nicotina varía de acuerdo a los individuos, dado a que el gen de CYP2A6 suele presentar variantes genéticas lo que produce enzima mutadas que tienden a actuar diferente, catabolizando de forma lenta, en algunos casos provocando que las persona que tienen deficiencia en la actividad enzimática sean menos propensas a la adicción de la nicotina ya que su metabolismo es más lento de lo normal y requieren de menor ingesta para el mismo efecto (Pianezza, Sellers, & Tyndale, 1998).

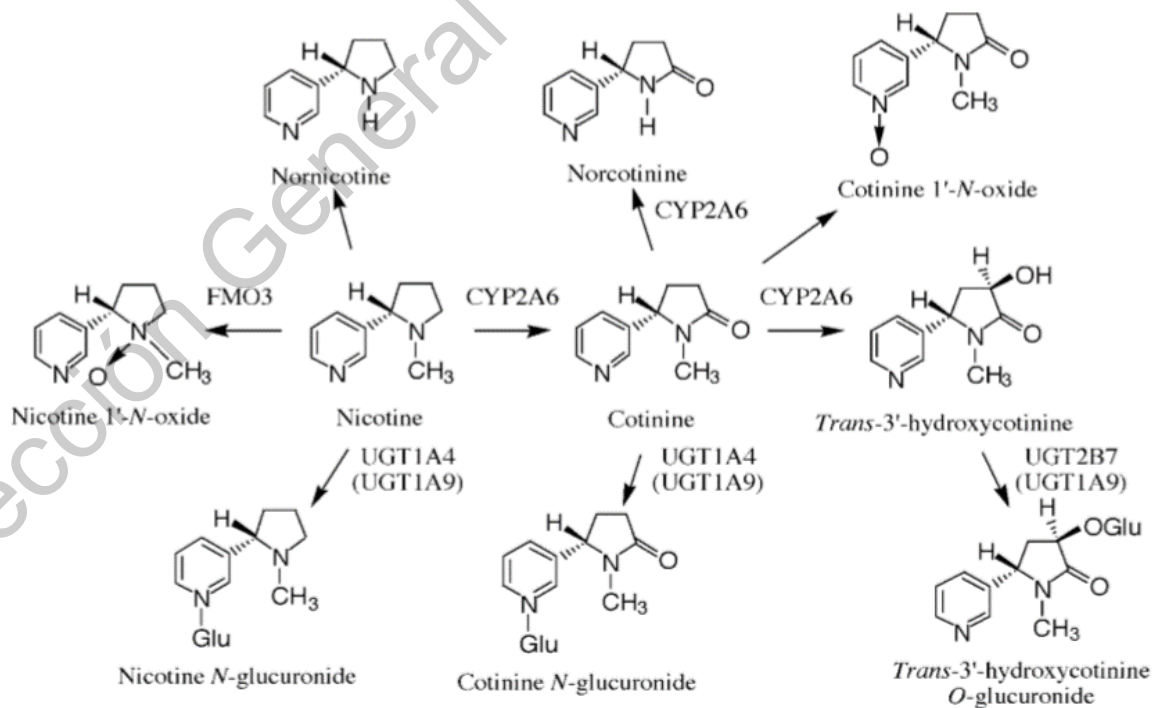


Figura 5. Vía metabólica de nicotina en humanos (Nakajima & Yokoi, 2005).

La absorción de la nicotina mediante la respiración es inmediata, pasa al torrente sanguíneo y es distribuida por todo el organismo. En el hígado es convertida en cotinina mediante una  $\alpha$  – oxidación por la aldehído oxidasa y subsecuentemente es hidroxilada a trans-3'-hidroxicotinina por la misma CYP2A6. Después, estas tres moléculas son glucoronizadas a nicotina N-glucoronida, cotinina N-glucoronida y trans-3'-hidroxicotinina O-glucoronida, respectivamente. Por último, el 85 – 95% de nicotina consumida se elimina por orina en forma de estas seis moléculas en sus distintas conjugaciones. Otra cantidad mínima de metabolitos son la nicotina 1'-N-oxido, formada por la flavina monooxigenasa 3 (FMO3), nornicotina, norcotinina y cotinina 1'-N-oxido, cuyas enzimas catalizadoras no son bien conocidas (Nakajima & Yokoi, 2005).

El organismo tiende a reaccionar ante este tipo de componentes mediante diferentes mecanismos de biotransformación, donde participan enzimas de la familia de citocromo P450 que es caracterizada principalmente por sintetizar proteínas que participan en la fase I, fase II y fase III de la biotransformación de xenobióticos, con el objetivo de activar, inactivar y/o eliminar dichas moléculas, en la primera fase, regularmente se lleva a cabo la activación del xenobiótico para que este lleve a cabo su función, en la fase II se lleva a cabo la conjugación para estabilizar la molécula y poder pasar a la fase III donde se procede con la eliminación, principalmente por vía biliar, por orina e incluso por la respiración (Almazroo, Miah, & Venkataramanan, 2017).

## 2.5 Formación de aductos de ADN – Benzopireno diol epóxido (BPDE)

Dentro de las isoenzimas más estudiadas con relación a cáncer en general se encuentran las de fase I monooxigenasas citocromo P450 (CYP2D6, CYP2C19, CYP17 y CYP1A1), involucradas en la biotransformación de xenobióticos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPAs), nitrosaminas y dioxinas, como las que se encuentran en el humo del tabaco (González, F. J. & Tukey, R. H., 2012; K. Lee et al., 2006). Tal es así que un estudio realizado en pacientes de China demostró que los individuos con interacción de polimorfismos de CYP2A6, CYP1A1 y CYP2D6 de ADN en muestras sanguíneas podrían aumentar la susceptibilidad genética al cáncer pulmonar, sin embargo, no se encontró ninguna relación entre el cáncer pulmonar y los polimorfismos de genes individuales (Huang et al., 2013). En el caso de CYP1A1 específicamente, funciona en xenobióticos desintoxicantes, HAP, aminas heterocíclicas, aflatoxinas, cafeína y fármacos, como el paracetamol, granisetron, clozapina y R-warfarina, omeprazol, ketoconazol, estrona, 17  $\beta$ -estradiol, teofilina, cloroquina, haloperidol, carvedilol, dacarbazina, fenacetina y riluzol, 2-(4-Amino-3-metilfenil), -5-fluorobenzotiazol, 5-aminoflavona, benzo [a] pireno-7,8-diol, debrisoquina, flutamida, melatonina, 7-etoxiresurona, 7-etoxicumarina y tegafur, ya que se tiene previsto que son metabolizados por CYP1A1, además, las isoenzimas CYP1 metabolizan varias sustancias endógenas, como la melatonina, las hormonas esteroideas y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Brown, Reisfeld, & Mayeno, 2008; Ghaffarian-Bahraman et al., 2017; Nebert, Dalton, Okey, & Gonzalez, 2004; Pragyán, Kesharwani, Nandekar, Rathod, & Sangamwar, 2014), pero ocasionalmente convierte compuestos en genotoxinas (Willis et al., 2018). Los alelos particulares de CYP1A1, como CYP1A1 I462V se han correlacionado con una mayor incidencia de cáncer de mama y pulmón *in vitro*, pero se desconoce si estas variantes expresan enzimas *in vivo* que son más potentes en la generación de genotoxinas (Freedland, Cera, & Fasullo, 2017).

Se conoce que la activación transcripcional del gen CYP1A1 está mediada por la unión de contaminantes ambientales y sustancias químicas de inhalación

(como hidrocarburos aromáticos policíclicos, dioxinas y nitrosaminas), al receptor de hidrocarburo aromático citoplasmático (ARH), así como la translocación al núcleo y su posicionamiento específico en el ADN (Androutsopoulos, Tsatsakis, & Spandidos, 2009) causando, incluso, efectos carcinogénicos de los HPA que se clasifican en dos vías: la vía genómica y la no genómica como se muestra en la figura 6; la primera consiste en la inducción de genes que codifican enzimas que participan en la bioactividad de los HPAs, por ejemplo, la enzima CYP1A1 es inducida en el tejido pulmonar de los fumadores de tabaco ya que cataliza la conversión de HPA formando dioles epóxidos que son capaces de reaccionar en el ADN produciendo lesiones premutagénicas en proto-oncogenes proximales, es decir, formar aberraciones que desembocan en proteínas erróneas (Anttila et al., 2001; Sadeck, Ibrahim, & Alassal, 2014; Vázquez-Gómez et al., 2016).

La vía no genómica está relacionado con el ARH el cual se encuentra unido a un complejo citosólico que consiste en dos proteínas de choque térmico Hsp-90, una co-chaperona p23 de interacción con Hsp-90 y una inmunofilina como la proteína XAP2 (Androutsopoulos et al., 2009), para activar dicho receptor, requiere de su translocación al núcleo, por lo que se disocia de dicho complejo, entonces, cuando un HPA es unido a su receptor (ARH), conduce a la transformación del complejo del receptor (ARH) a la dimerización con el translocador nuclear de receptor de hidrocarburo aromático (ARNT), el cual originalmente se encuentra inhibido formando un dímero con el represor del receptor de hidrocarburos aromáticos (AhRR) en el núcleo; la importación nuclear se inhibe por las reacciones de fosforilación de los residuos Ser-12 o Ser-36 de la señal de localización Nuclear (NLS), mientras que la fosforilación de los residuos de fosfotirosina en el carboxilo terminal del AhR se requiere para la formación del complejo funcional AhR / ARNT, luego, este complejo interacciona con proteínas acetil transferasas de histonas y factores remodeladores de cromatina, lo que resulta en un aducto de ADN, unido a una secuencia consenso conocida como elemento de respuesta a xenobióticos o elementos de respuesta a dioxinas (5'-GCGTG-3'), ubicando a esta secuencia rio

arriba de sus genes blancos, dentro de los cuales se incluyen aquellos que codifican enzimas del metabolismo de los xenobióticos, como las isoenzimas CYP1, NAD(P)H, quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión S-transferasa (GST) A2, aldehído deshidrogenasa 3A1 y familia 1 UDP-glucuronil transferasa, además, codifica proteínas que controlan la división celular, la diferenciación y la apoptosis (por ejemplo, Bax, c-jun, c-myc, Hes-1, IL-2, junD, p21<sup>CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup>), así como una retroalimentación negativa inhibidor de la señalización AHR, el represor AHR (AHRR) (Bock & Köhle, 2006).

Los genes de la fase I de la biotransformación de xenobióticos que son regulados por el complejo AHR-ARNT, solo incluyen a los miembros de la familia CYP1 de los CYP450, para esto, se requiere de una maquinaria de transcripción la cual se produce a través de la interacción de varios factores de transcripción como Sp1 y coactivadores como p-300 y p / CIP, lo que finalmente conduce a la unión con TBP (proteína de unión a TATA) y posteriormente al reclutamiento de ARN polimerasa II (Androutsopoulos et al., 2009; Anttila et al., 2001; Sadeck et al., 2014; Vázquez-Gómez et al., 2016).

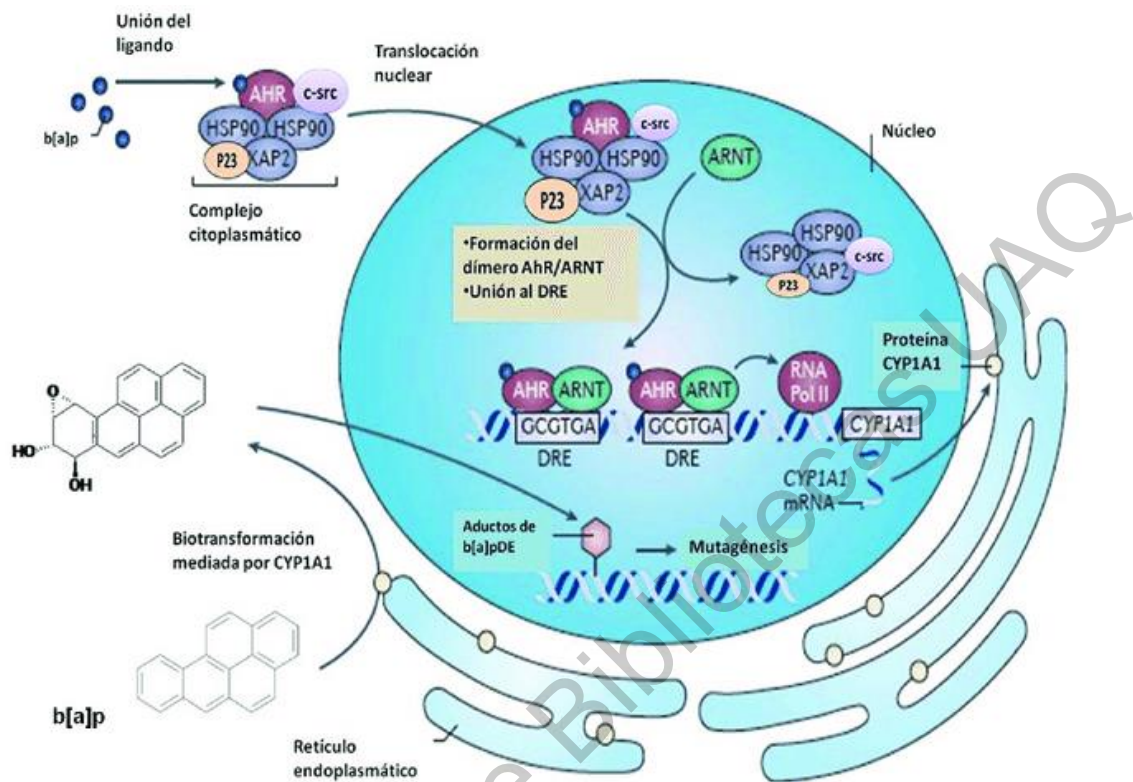


Figura 6. Activación del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (Vázquez-Gómez et al., 2016).

Se han identificado tres vías de acción del receptor de hidrocarburos, la primera, conocida como la vía extrínseca, donde el receptor requiere de un ligando exógeno para su activación; la segunda, es donde el receptor interactúa con diferentes proteínas de señalización celular con Rb y E2F ya sea en presencia o ausencia de un inductor como el factor de crecimiento; y la tercer vía es llamada intrínseca donde se cree que depende de ligandos endógenos pero sus mecanismos no son exactamente descritos (Androutsopoulos et al., 2009). Dentro de los ligandos que se han identificado se encuentran HAP, dibenzo-p-dioxinas, dibenzofuranos y PCB similares a las dioxinas, así como polifenoles derivados de plantas y bacterias (Abel & Haarmann-Stemann, 2010; Denison, Soshilov, He, DeGroot, & Zhao, 2011; Hubbard et al., 2015; Murray, Patterson, & Perdew, 2014; Stejskalova, Dvorak, & Pavek, 2011).

Con la intención de detectar la expresión de CYP1A1 en tejido pulmonar clínicamente sano, se ha evaluado mediante RT-PCR; sin embargo, su expresión fue débil, también se determinó la actividad de la enzima por medio de ensayos 7-etoxi-resorufina-O-desetilasa (EROD) demostrando alta actividad de la enzima (rango de 7 a 31 nmol/mg/proteína/min), método que ha sido reproducido en distintos estudios de investigación, así también se ha determinado el RNAm mediante técnicas de RT-PCR en presencia y ausencia de inductores como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y piridina, nicotina y omeprazol (Bernauer, Heinrich-Hirsch, Tönnies, Peter-Matthias, & Gundert-Remy, 2006; Wei, Caccavale, Weyand, Chen, & Iba, 2002, p. 200). Dichas evaluaciones también se han realizado en tejido pulmonar de pacientes con cáncer (adenocarcinoma de pulmón y carcinoma broncoalveolar mixto) donde la expresión del ARNm tanto de AhR y CYP1A1 se asoció con el tabaquismo de pacientes con adenocarcinoma pulmonar (Chang, Chang, Chen, Lin, & Lin, 2007); sin embargo, también se ha observado la expresión de CYP1A1 en tejidos cancerosos tanto de esófago como de vejiga en al menos 60% y 68% de los casos, respectivamente, lo que se atribuye a la conocida función activadora de carcinógenos de CYP1A1, ya que estos tienden a traspasar las membranas del tejido pulmonar y llegar a torrente sanguíneo, donde viajan a través del cuerpo metabolizándose así, en diferentes células del organismos (Androutsopoulos et al., 2009). Como resultado de la exposición a compuestos ambientales con actividad pro-mutagénica / pro-carcinogénica, la expresión basal de CYP1A1 en tejidos extrahepáticos está vinculada en gran medida al mecanismo de la carcinogénesis en diferentes tejidos, es decir, los efectos carcinogénicos de dichos compuestos también llegan a afectar otros tejidos como la vejiga, colón, páncreas, etcétera donde la expresión normal de CYP1A1 de las células correspondientes aumenta dada a la estimulación repitiendo así, el mismo mecanismo de mutación que se da a nivel pulmonar (Androutsopoulos et al., 2009).

Se ha demostrado que el tabaquismo tiene un mayor detonante de cáncer pulmonar en mujeres que en varones, ya que por diversos factores como la



intervención hormonal del tratamiento con estrógenos en la menopausia, incrementa el riesgo de padecer cáncer de pulmón puesto que se ha encontrado que las mutaciones en genes como p53, CYP1A1, GSTM1 y k-ras son más frecuentes en ellas (Liras et al., 2007).

CYP1A1, al igual que la mayoría de la familia del citocromo P450, así como las involucradas en la fase II de la biotransformación como la glutatión transferasa, se encargan de metabolizar la mayoría de los carcinógenos del tabaco (tales como HPA y NNK). Durante este proceso algunos compuestos forman aductos del ADN (complejo que se forma cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica, como ADN o proteínas) comúnmente se unen al Nitrógeno de la posición 3 de la guanina y a los átomos de Hidrógeno unidos a los de Nitrógeno en las posiciones uno y dos de la guanina y al átomo de Oxígeno de la citosina. Si los aductos persisten, modifican la estructura del ADN, lo que provoca que las polimerasas durante la replicación inserten bases equivocadas y causen mutaciones permanentes, tal es el caso de cáncer de mama, colon, vejiga, entre otros, sin embargo, el consumo de tabaco no asegura el padecimiento del cáncer pulmonar o de otros tipos de cáncer, esto se debe a una variación genética (susceptibilidad) en las enzimas metabolizantes de carcinógenos (CME)- GSTM1 glutatión transferasa y CYP 450, que define la resistencia del organismo a la progresión del cáncer pulmonar (Acuña & Román, 2013; Franco Tobón & Ramírez Botero, 2013; Vázquez-Gómez et al., 2016).

El benzo (a) pireno, es uno de los carcinógenos más abundantes y de mayor potencia que además del tabaco, también se ha encontrado en agua, alimentos, contaminantes ambientales, alquitrán, brea, hollín, entre otros componentes. La facilidad de introducirse al organismo, se debe a que es altamente soluble en compuestos orgánicos lipofílicos y que es altamente volátil. Este es producido dado a la combustión incompleta de la materia orgánica (como incendios forestales, carbón, petróleo, fogatas, chimeneas, etc), en la emisión de gases. Estos carcinógenos, durante el metabolismo, tienden a formar moléculas reactivas afines

al ADN para generar de esta forma los aductos. Solo algunos de estos aductos pueden ser de particular importancia mutagénica (por ejemplo, aductos O6 sobre guanina), la suma total de aductos se correlaciona con la cantidad de los aductos realmente significativos, y es por lo tanto un biomonitor válido de genotoxicidad (Phillips et al., 2000).

Existen otros métodos para la evaluación de la presencia de aductos en el ADN, por ejemplo, la espectrometría de masas que, para ser altamente eficaz, el compuesto objetivo deberá ser volátil, también existen métodos fisicoquímicos que suelen tener variabilidad en la especificidad, por otro lado, están los inmunoensayos que tienen la propiedad de la alta especificidad mediante anticuerpos, entre otros, cuya evaluación se considera un indicador adecuado de genotoxicidad. Dichas mediciones de aductos totales incluyen claramente todas las bases de ADN modificadas del compuesto y de cada uno de sus metabolitos; sin embargo, se han estudiado aductos específicos como el de ADN - epóxido de benzo (a) pirenodiol (BPDE) que han sido utilizados para evaluar el daño en ADN asociado a mutagénesis en linfocitos T activados en fumadores y no fumadores (Liamin et al., 2017) y en pacientes con cáncer de pulmón, también se han analizado los aductos específicos de p53 (Denissenko, Pao, Tang, & Pfeifer, 1996).

En el mismo sentido, además de estos enfoques genéticos, se ha determinado en epigenética que la metilación del ADN está estrechamente relacionada con la inactivación de diversos genes, involucrándose así, en procesos de proliferación y desarrollo tanto en células sanas como en células cancerígenas de diferentes tejidos, denotando en su mayoría con hipermetilación (Thompson & Robertson, 2017).

## 2.6 Metilación de ADN

Las reacciones del organismo ante distintas exposiciones ambientales, se basan en desencadenar una serie de eventos moleculares que inducen al ADN a ejercer una respuesta ante este estímulo, sintetizando diferentes proteínas o RNAs como en el caso de CYP1A1, de esta misma forma, pero desde un arreglo epigenético del ADN, es como también se controla la expresión y silenciamiento de genes que se ven involucrados en la función tanto celular como del tejido, repercutiendo así, en procesos proliferativos y de angiogénesis que en su mayoría son estimulados por factores ambientales como el tabaquismo (Q. Liu et al., 2011).

Evidencias sugieren que la mayoría de los cambios de metilación del ADN, son sucesos programados por el mismo proceso de envejecimiento, predisponiendo de esta forma a la tumorigénesis (Klutstein, Nejman, Greenfield, & Cedar, 2016). Se ha comprendido que a lo largo de la vida, el comportamiento del epigenoma cambia a nivel global, en regiones específicas del ADN y en regiones repetitivas como los elementos Alu (M. J. Jones, Goodman, & Kobor, 2015) y LINE-1 por lo que se ha estimado la evaluación de estos como un sustitutivo al porcentaje de metilación global de ADN (Joyce et al., 2016).

tal es el efecto, que, más del 50% de los diferentes tipos de cáncer en el ser humano mantienen mutaciones en genes que codifican a enzimas involucradas en la organización de la cromatina (P. A. Jones, Issa, & Baylin, 2016).

El ADN y su interacción con distintas proteínas forman el nucleosoma, dichas proteínas están formadas por un octámero de histonas las cuales a su vez son estructuradas por una región central plegada que interacciona directamente con el ADN y por un dominio N-terminal conocido como “cola de Histonas”, los cuales llevan a cabo rearrreglos dinámicos que exponen o resguardan los genes de acuerdo a las necesidades de la célula (Krause, Castro-Rodríguez, Uauy, & Casanello, 2016).

Las funciones y las interacciones antes mencionadas, están estrechamente relacionadas con el estado de metilación tanto en el ADN como en las histonas, que en el caso particular de éstas, se ha evaluado la relación con el estrés oxidativo, donde se comprobó mediante la exposición de células bronquiales humanas inmortalizadas (Manassas,VA) a sustancias como el peróxido de hidrógeno y ascorbato a distintos periodos de tiempo corto (3 horas) y largo plazo (3 semanas) presentan aumento en las marcas de metilación de las histonas y disminución de la acetilación que con la preincubación con ascorbato se atenuaron dichos cambios. Con esto se concluye que el estrés oxidativo altera temporalmente el proceso del programa genético mediante la modulación de enzimas responsables de la desmetilación y desacetilación de histonas como histona desacetilasa (HDAC) clase I, II y III o las histonas desmetilasas (Niu, DesMarais, Tong, Yao, & Costa, 2015).

Se ha demostrado que la metilación de las histonas también tienden a afectar al grado de metilación del ADN, tal es el caso de una proteína arginina metiltransferasa llamada PRMT6, que es responsable de la dimetilación asimétrica de la histona 3 (H3R2me2a) que repercute negativamente en la metilación del ADN, es decir, cuando existe una regulación positiva de PRMT6 contribuye a la hipometilación global del ADN durante el proceso de la carcinogénesis (Veland et al., 2017).

Dada a la hipometilación global del ADN y a la hipermetilación regional del mismo determina que en este último, los genes se encuentran inactivos o silenciados y en la hipometilación regional sucede lo contrario, es por lo que la metilación está relacionada con la carcinogénesis reconociéndose como una marca epigenética para el cáncer, pero en este sentido, el genoma se identifica con hipometilación a lo largo de la vida tumoral (Guardiola, Vallvé, Zaina, & Ribalta, 2016); sin embargo, se ha descrito que la hipermetilación en el ADN está estrechamente relacionada con el silenciamiento de aquellos genes que sintetizan proteínas involucradas en el control del ciclo celular, apoptosis, proliferación,

diferenciación e incluso genes supresores de tumores que por ende, conllevan a la tumorigénesis, descubrimientos que se enfocan también al diagnóstico temprano de dicha patología o a sus respectivas dianas terapéuticas (Ansari, Shackelford, & El-Osta, 2016).

Del mismo modo en que afectan factores ambientales, se ha identificado que hábitos como la actividad física y el tipo de alimentación de cada individuo impactan en la metilación del ADN, por ejemplo, los entrenamientos tanto agudos como crónicos repercuten en la metilación en tejidos y genes específicos. En el mismo sentido se detectó que la actividad física a largo plazo reduce el riesgo y la mortalidad en varios tipos de cáncer, principalmente de mama y colon. Específicamente en el caso de pacientes con carcinoma gástrico mostraron mayor metilación en el gen CACNA2D3 (gen del canal de calcio normalmente metilado en cáncer gástrico) en los casos sin actividad física frente a los pacientes del mismo diagnóstico pero con actividad física, sin embargo, a pesar de que en casos oncológicos se encuentran regiones específicas metiladas o silenciadas, en general, el resto del ADN tiende a encontrarse hipometilado, lo que aumenta la inestabilidad del genoma mediante la activación de secuencias repetitivas como los elementos nucleares largos intercalados (LINE) que suelen estar silenciados por hipermetilación, que en relación a lo anterior, se ha comprobado que la reducida actividad física se asocia con el aumento de metilación (Voisin, Eynon, Yan, & Bishop, 2015).

La relación estrecha entre la metilación y los hábitos nutricionales y tabáquicos se basa en las distintas formas de estimularla mediante factores externos al organismo, los cuales activan el ciclo del folato, metionina y la transulfuración (Koseki et al., 2018).

El folato, no es generado por el organismo, por ende, debe obtenerse por medio de alimentos. Su forma activa es el tetrahidrofolato (THF) que se encarga de suministrar grupos de un solo carbono (como el metilo) a moléculas como los nucleótidos, mediante la dihidrofolato reductasa (DHFR). Se ha descrito que el

déficit de folato en humanos resulta en la reducción de síntesis del ADN y la metilación, por lo que la inhibición de la DHFR causa toxicidad en las células normales y en las cancerosas. Por otro lado, también tiene la capacidad de convertir homocisteína a metionina por la donación del grupo metilo de la 5-metil-THF, sin embargo, una baja en la producción de 5-metil-THF es asociado a niveles altos de homocisteína e hipometilación del ADN (Koseki et al., 2018).

En el ciclo de la metionina, está convertida en S-adenosilmetionina (SAM) por la metionina adenosiltransferasa (MAT), dicha enzima está codificada por MAT1A y MAT2A que cuando uno de estos presenta variaciones en su expresión, es altamente relacionado con la carcinogénesis (Y. Liu et al., 2015). Cuando SAM dona su metilo, forma S-adenosil-homocisteína (SAH), la cual se libera del grupo adenosil para resultar en homocisteína que puede ser catabolizada a cisteína a través de la vía de la transulfuración donde luego de varias reacciones, es convertida en piruvato y succinil CoA para la gluconeogénesis. El potencial de metilación de una célula, puede ser evaluado de acuerdo al ratio de SAM/SAH, el cual tiende a ser disminuido por hiperhomocisteinemia, lo que provoca disminución de dicho potencial (Guardiola et al., 2016).

Por parte del tabaquismo, también existe relación a la metilación causada por la hipoxia, ya que el monóxido de carbono se une a la hemoglobina competitivamente ante el oxígeno, disminuyendo la oxigenación del tejido, lo que provoca que se activen distintos mecanismos de defensa como el Factor Inducido por Hipoxia (HIF) favoreciendo la angiogénesis y la regulación positiva de la MAT dependiente de HIF-1 $\alpha$  (Grau, 2011).

La metilación más identificada es mediante la adición covalente del grupo metilo en el carbono 5 del anillo de la citocina, formando la 5-metilcitocina, ubicándose en el surco principal del ADN inhibiendo la transcripción, frecuentemente junto a una guanósina, encontrándose 10 veces más en las islas CpG (CGI) que en el resto del genoma. Dichas Islas se encuentran frecuentemente en las regiones reguladoras de diversos genes, donde la 5-metilcitocina genera el

silenciamiento de los genes provocando un cambio conformacional de la cromatina, dificultando de esta forma la unión de diversos factores de transcripción; proceso que, en células cancerígenas, tiende a silenciar genes involucrados en la reparación, silenciamiento que puede continuar en el resto de la proliferación (Bhat et al., 2017).

Se ha demostrado una amplia gama de genes silenciados por la metilación del ADN, como se muestra en la figura 7, en diferentes tipos de cáncer (Kulis & Esteller, 2010) como en el caso de cáncer pulmonar causado por tabaquismo, así como en no fumadores (Gazdar & Zhou, 2018) lo que sugiere como un biomarcador genético ante casos por tabaquismo y otra etiología.

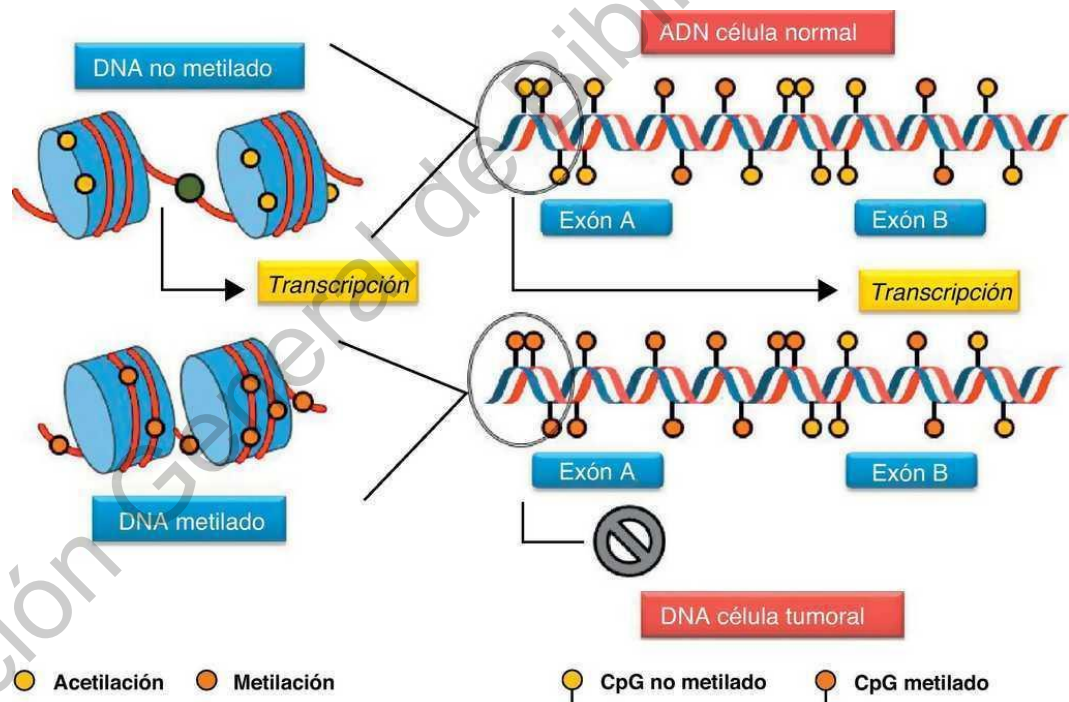


Figura 7. Metilación de ADN y silenciamiento de genes (Kulis & Esteller, 2010).

El comportamiento epigenético en una célula carcinogénica adquiere tres características de suma importancia. Primero existe una recombinación mitótica

descontrolada dada a la hipometilación en la heterocromatina que activa los genes; segundo, la hipermetilación en genes específicos o individuales y tercero la hipermetilación en regiones ricas en CpG de genes constitutivos o supresores de tumores. Tanto la hipermetilación como la hipometilación pueden encontrarse de forma individual o simultáneamente, estando presente la primera en el silenciamiento de genes y la segunda en la sobreexpresión de algunas proteínas cuya función sea necesaria para los procesos invasivos o de metástasis (Sandoval, Vasquez, Souza-Mello, Alberto Mandarim-de-Lacerda, & del Sol, 2018).

Con respecto a lo anterior, existen patrones de aberraciones en cuanto a la metilación, que incluyen la pérdida de metilación en secuencias normalmente metiladas o también la metilación en secuencias normalmente no metiladas. En el mismo sentido, se han detectado aberraciones en ARN no codificante cuya función puede ser indispensable en el proceso de la tumorigénesis. Genes encontrados con hipermetilación en cáncer de pulmón son CDKNA/P16INK4a, RASSF1, MGMT, APC, DAPK, FHIT, CDH13, RAR  $\beta$ , SHOX2, RUNX3, CDH1, TSCL1, ASC/TMS1, DAL1, PTEN, GSTP1. Sin embargo, la hipometilación está relacionada con estadios avanzados en cáncer de pulmón, específicamente en los genes MAGEA, TKTL1, BORIS, DDR1, TMSB10, ROR1 (Moreno, Bruges, Arboleda, & Jaramillo, 2016).



### **3 Hipótesis**

Los fumadores pasivos pueden presentar porcentaje de metilación global del ADN similares a los que desarrollan los fumadores activos y los pacientes que han desarrollado cáncer de pulmón.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **4 Objetivos**

### **4.1 General**

Asociar el grado de exposición al humo del tabaco en: 1) individuos no fumadores, 2) fumadores pasivos, 3) fumadores activos y 4) pacientes con cáncer pulmonar y su porcentaje de metilación global de ADN.

### **4.2 Particulares**

- Determinar el porcentaje de metilación global del ADN en muestras sanguíneas de todos los grupos de estudio.
- Identificar si existe una asociación entre las diferentes formas de exposición al humo del tabaco, el cáncer pulmonar y el porcentaje de metilación global del ADN.

## **5 Metodología**

### **5.1 Diseño**

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo observacional, transversal y comparativo.

#### **5.1.1 Definición del Universo**

Participantes de 40 años en adelante que sean no fumadores, fumadores pasivos o fumadores activos del estado de Querétaro.

Pacientes de 40 años en adelante que sean diagnosticados con cáncer de pulmón en el ISSSTE hospital general de Querétaro.

#### **5.1.2 Tamaño de muestra**

El tamaño de muestra fue obtenido por conveniencia, conformando a los grupos de la siguiente forma.

Grupo de No fumadores: 10

Grupo de Fumadores pasivos: 7

Grupo de Fumadores activos: 9

Grupo de pacientes con cáncer pulmonar: 4

### 5.1.3 Definición de las unidades de observación

De acuerdo con la tabla 3, se definen los grupos a evaluar.

Tabla 3. Definición de unidades de observación.

<b>Unidades de observación</b>	<b>Definición</b>	<b>Unidad de medida</b>
<b>No fumadores</b>	Personas que no fumen activa ni pasivamente.	Sin consumo de cigarros
<b>Fumadores pasivos</b>	Personas que conviven con fumadores activos durante mínimo 1 hora al día.	Horas de exposición al humo del tabaco por día
<b>Fumadores activos</b>	Personas que fumen de forma habitual o esporádica durante el último año.	Número de cigarros al día
<b>Pacientes con cáncer pulmonar</b>	Pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar (estadios I, II, III y IV en cualquier subclasificación)	Número de cigarros que solía fumar al día

### 5.1.4 Grupo control

El grupo control se conformó por personas no fumadoras de 40 años en adelante, de sexo indistinto.

### 5.1.5 Criterios de inclusión

- a) Los integrantes de todos los grupos tuvieron de 40 años en adelante ya que esta población es donde inicia el desarrollo del cáncer pulmonar y éste no es detectado dado a la ausencia de sintomatología. No se discriminó por género.
- b) Pacientes con cáncer pulmonar: Personas diagnosticadas en los diferentes estadios de cáncer pulmonar (I, II, III, IV), diagnosticados por primera vez, cuyo tumor primario fue en pulmón.

- c) Fumadores activos: fueron personas que mantienen el hábito de fumar más de 2 cigarrillos por día durante el último año.
- d) Fumadores pasivos: fueron personas que se encuentran expuestas al humo del tabaco de segunda mano al menos una vez por semana.
- e) No fumadores: Fueron personas que no están expuestas activa ni pasivamente al humo del tabaco.

#### 5.1.6 Criterios de exclusión

- a) Ningún integrante debió ser asistente frecuente a sitios con alto nivel de humo como en fábricas, chimeneas, quemadores, entre otros. Personas con dichas características fueron excluidas del protocolo ya que se ha comprobado que la exposición a ciertos emisores de humo distintos al tabaco, son también causantes de cáncer pulmonar. Así mismo, ninguna participante debió estar embarazada o en etapas de lactancia, llevar tratamiento con dacarbazina y/o tegafur ni tener diagnóstico previo de alguna enfermedad pulmonar, ya sea crónica o aguda, o cualquier otro tipo de cáncer.
- b) Para pacientes con cáncer pulmonar: se excluyeron aquellos cuyo tumor pulmonar fuera por metástasis.
- c) Fumadores activos, pasivos y no fumadores: aquellos que tengan antecedentes de cáncer pulmonar.

#### 5.1.7 Criterios de eliminación

- a) Fueron eliminados aquellos pacientes cuya muestra fue insuficiente y no se pudo acceder a otra recolección.
- b) Se eliminaron a los participantes cuya información fue incompleta y difícil de obtener.

### 5.1.8 Definición de variables y unidades de medida

De acuerdo con la tabla 4, se mencionan tanto la definición, las unidades de medida y el tipo de variable que son el tabaquismo, los niveles de cotinina sérica y el porcentaje de metilación global de ADN.

Tabla 4. Características de la variable.

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Tipo de variable</b>
Tabaquismo	Inhalación del humo de tabaco de forma pasiva	Horas de exposición al humo de tabaco	Cuantitativa discreta
	Inhalación del humo del tabaco de forma activa	Número de cigarros consumidos al día	Cuantitativa discreta
Cotinina sérica	Concentración sérica del metabolito principal de la nicotina	ng/mL	Cuantitativa continua
Metilación global de ADN	Porcentaje de ADN con 5-metilcitosina	%	Cuantitativa continua

### 5.1.9 Fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información

- a) Invitación general a la participación en el proyecto de investigación mediante trípticos y exposiciones verbales.

El proceso de invitación a pacientes con cáncer pulmonar inició con un convenio entre autoridades del hospital General de Querétaro ISSSTE y el investigador como parte de la institución (ver anexo 1) para permitirnos la identificación y acceso a dichos pacientes a quienes se les explicó detalladamente el procedimiento y objetivos del estudio. Por otro lado, se

realizó la invitación a ciudadanos de Querétaro, mediante trípticos informativos donde se expresaron brevemente los pasos a realizar, los criterios de inclusión y exclusión.

- b) Inducción al proyecto y confirmación mediante una carta de consentimiento informado.

A lo largo de la inducción se explicó detalladamente la justificación, argumentación, estado del problema y objetivo principal por el cual se realizó este proyecto, así como los pasos a detalle de la metodología para finalmente invitar a los interesados a firmar una carta de consentimiento informado e incluirlos al protocolo (Ver anexo 2).

- c) Aplicación del cuestionario sobre hábitos relacionados al tabaquismo.

A todos los interesados se aplicó dicha herramienta, la cual ayudó a determinar los hábitos relacionados al tabaquismo de cada persona para posteriormente poderlos clasificar (Ver anexo 3).

- d) Clasificación de integrantes.

Mediante los resultados obtenidos en el inciso anterior, se clasificaron a los grupos en no fumadores, fumadores pasivos, fumadores activos y pacientes con cáncer pulmonar.

## 5.2 Procedimientos

### 5.2.1 Obtención de muestra sanguínea con EDTA (Etilendiaminotetracético) y sin anticoagulante.

Se tomó la muestra sanguínea periférica preferentemente en el área antecubital del brazo colocando el torniquete y palpando la vena. Una vez seleccionada, se descontaminó el área a punzar con ayuda de una torunda con alcohol al 70%. En un ángulo de 45°, se introdujo la aguja unida al sistema vacutainer en dirección de la vena hasta estar dentro de ella, se insertaron cuidadosamente los tubos de recolección al sistema vacutainer (uno con anticoagulante y otro sin anticoagulante) para proceder con el llenado al vacío. Posteriormente se retiró del sistema vacutainer el tubo con la muestra sanguínea, se quitó/aflojó el torniquete y se retiró la aguja unida al sistema vacutainer. Por último, se colocó una torunda sin alcohol en el área de punción por 5 min para evitar el sangrado.

Las muestras fueron alicuotadas en 4 microtubos de 1 ml en el caso de la sangre total y el suero se extrajo en 2 microtubos de 1 ml para almacenarlas a -80°C en un ultracongelador. Los residuos generados durante el análisis y el destino final de las muestras fueron manipulados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

### 5.2.2 Determinación de la concentración de cotinina sérica

Este procedimiento fue realizado con el kit de cotinina en suero, NEOGEN, mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés).

Antes de usar un nuevo kit, se preparó la enzima completamente diluida agregando exactamente 150 µL de conjugado de enzima cotinina al diluyente de la enzima. El recipiente con la mezcla se invirtió suavemente 15 veces. Por recomendación de la casa de reactivos, la enzima completamente diluida se preparó 3 días antes de su uso.



La solución de lavado 10X fue diluida a 1X con agua destilada agregando 5 mL de reactivo a 45 mL de agua destilada. Se esperó por 60 minutos para que los componentes y las muestras del kit alcancen la temperatura ambiente (20 a 23 °C). Se mezclaron bien por inversión suave antes de usar. Se pipeteó 20 µL de muestras de suero y estándares en diferentes pozos de la tira. Inmediatamente se agregó 100 µL de conjugado de enzima cotinina preparado a cada pozo (refiérase a la preparación de enzima del primer paso). Antes de administrar la enzima, se invirtió suavemente varias veces. Se incubó a una temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas a 500 rpm. Se extrajo la solución de los pozos y luego se secó una vez en papel absorbente. Se agregó 350 µL de solución de lavado a cada pozo. Se vació la solución de lavado y la placa se absorbió contra el papel tres o cuatro veces para eliminar el exceso de humedad. Se repitió el paso de lavado dos veces más. Se procedió inmediatamente a la adición del sustrato evitando que los pozos se sequen. Se pipeteó 150 µL de sustrato K-blue en cada pocillo. Se permitió que la reacción del sustrato continuara durante 15 min, se detuvo la reacción agregando 150 µL de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N) a cada pocillo, por último, se midió la absorbancia a 450 nm.

Para llevar a cabo la evaluación de cotinina sérica en cada integrante, se realizó una curva de calibración con los estándares de 0, 10, 25 y 50 ng/mL; medidos por duplicado incluidos en el kit de cotinina en suero, NEOGEN, mostrando el comportamiento de los promedios de cada uno en la figura 8, dando una línea de tendencia polinómica de segundo grado con la ecuación  $y = 0.4938842 + (0.928 - 0.4938842)/(1 + (7.628765)^{2622004})$  y un valor de  $R^2 = 1$ .

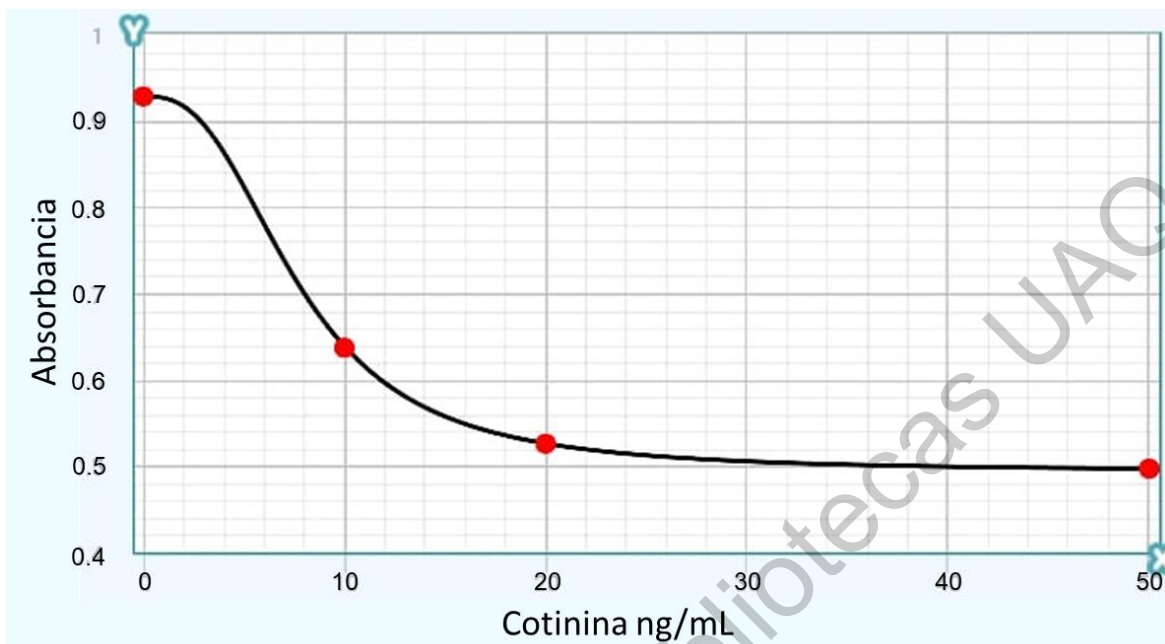


Figura 8. Curva de calibración de cotinina.

Una vez realizada la curva de calibración de cada uno de los métodos, nos percatamos que en el caso particular de la determinación de cotinina, el comportamiento de la curva no fue lineal, por lo que se hizo un análisis de la misma hasta obtener el modelo matemático adecuado. Para los puntos de evaluación que se ubicaban fuera del rango de lectura, fueron analizados mediante extrapolación con apoyo del software MyCurveFit BETA.

### 5.2.3 Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN de acuerdo a las instrucciones del kit utilizado (kit EZNA Blood DNA mini kit quick, OMEGA) llevando a cabo los siguientes pasos.

Se transfirió 200  $\mu\text{L}$  de la muestra sanguínea con EDTA a un tubo de microcentrífuga estéril y se llevó hasta un volumen de 250  $\mu\text{L}$  con buffer de elución. Se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de solución de proteasa OB y 250  $\mu\text{L}$  de buffer BL. Para después agitar en vortex por 15 s., se incubó a 65°C por 10 minutos. Se agitó en el vortex

una vez durante la incubación, se adicionó 260  $\mu\text{L}$  de etanol al 100 %. Se agitó en el vortex por 20 s., se centrifugó 10 s a 452.79 g para coleccionar cualquier gota que haya quedado en la tapa. Se insertó una mini columna HiBind DNA dentro de un tubo colector de 2 mL, se transfirió toda la muestra del paso 5 a la columna, se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto, se descartó el filtrado y el tubo colector. Se insertó la mini columna HiBind DNA dentro de un tubo colector de 2 mL nuevo, se adicionó 500  $\mu\text{L}$  de HBC buffer (diluido con isopropanol al 100%) y se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto, se descartó el filtrado del tubo colector y se colocó nuevamente la columna. Se adicionó 700  $\mu\text{L}$  de DNA wash buffer (diluido con etanol 100 %), se descartó el filtrado del tubo colector y se colocó nuevamente la columna. Se repitió el paso 12 para un segundo lavado, se centrifugó la mini columna HiBind DNA a 8,500 g por 2 minutos para secar la columna, se transfirió la mini columna HiBind DNA a un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas, se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de buffer de elución calentado a 65°C, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8,500 g por 1 minuto. Finalmente se repitió el paso 16 para una segunda elución con 25  $\mu\text{L}$  de buffer de elución calentado a 65°C para generar una segunda alícuota. Se guardó el ADN eluido a -20°C.

#### 5.2.4 Cuantificación de ADN.

Se determinó la pureza de la extracción de ADN mediante la absorbancia a 230 nm, 260 nm y 280 nm para cada una de las muestras, utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (Halo DNA Master, marca Dynamica) el cual a su vez indicó la concentración de ADN en ng/ $\mu\text{L}$  obtenido.

#### 5.2.5 Determinación de la integridad de ADN

Preparación del gel.

Se preparó 300  $\mu\text{L}$  de buffer Tris Acetato, EDTA (TAE) 1X para llenar la cámara de electroforesis y poder preparar el gel. Se pesó 1.5 g de agarosa (IBI Scientific, Peosta, Iowa, EE.UU) en 100 mL buffer TAE 0.5 X, se calentó en un microondas

por 45 segundos (se comprobó el volumen de la solución tras haberla calentado). Una vez obtenida una solución homogénea y clara, se esperó a que disminuya la temperatura a aproximadamente 50° para colocar en el molde con los peines. Una vez formado el gel, se retiró cuidadosamente el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis, se añadió el tampón de TAE 0.5 X a la cámara de electroforesis de modo que el gel quedó cubierto.

#### Preparación de la muestra

Se mezcló 7 µL de muestra con un buffer de carga (50% glicerol, 100 mM Na<sub>3</sub>EDTA, 1% SDS, 0.1% de azul de bromofenol pH8) adicionado con GelRed (1:1500) en una relación 3:10 (Buffer: muestra).

#### Electroforesis.

Se cargaron las muestras en pocillos consecutivos y el marcador de PM HyperLadder™ 50bp (Bioline) en el primer carril. Se cerró la tapa de la cámara y se conectaron los cables eléctricos para que el ADN migrara hacia el ánodo. Se realizó la electroforesis por 30 min a 110 V. Se desconectó la corriente y se destapó la cámara, se reveló el gel y se analizó utilizando un Sistema de Fotodocumentación UV (BioRad, Hercules, EE. UU).

#### 5.2.6 Determinación del porcentaje de metilación global de ADN

Se procedió de acuerdo a la metodología indicada en el kit MethylFlash Methylated DNA utilizando anticuerpos específicos a ADN-5 hidroximetilcitosina mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés).

#### Preparación de tampón de lavado 1X (ME1)

Se agregó 26 ml de ME1 10X Wash Buffer a 234 ml de agua destilada (pH 7.2-7.5).

#### Preparación del Control Positivo Diluido (ME4)

Primero, se diluyó ME4 a 10 ng /  $\mu$ L (5  $\mu$ L de ME4 + 5  $\mu$ L de 1X TE), luego, se prepararon 5 concentraciones diferentes con 10 ng /  $\mu$ L de ME4 diluido y 1X TE en 0.5, 1, 2, 5 y 10 ng /  $\mu$ L de acuerdo con la tabla 5:

Tabla 5. Diluciones para la curva de estandarización del porcentaje de metilación.

Tubo	ME4 )10 ng/ul	1X TE	Concentración final
1	1.0 $\mu$ L	19.0 $\mu$ L	0.5 ng/ $\mu$ L
2	1.0 $\mu$ L	9.0 $\mu$ L	1.0 ng/ $\mu$ L
3	1.0 $\mu$ L	4.0 $\mu$ L	2.0 ng/ $\mu$ L
4	2.5 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L	5.0 ng/ $\mu$ L
5	4.0 $\mu$ L	0.0 $\mu$ L	10.0 ng/ $\mu$ L

#### Enlace de ADN

Se agregó 80  $\mu$ L de solución de unión ME2 a cada pocillo, se agregó 1  $\mu$ L de ME3 y 1  $\mu$ L de ME4 diluido o 100 ng de su ADN de muestra (1-8  $\mu$ L) en los pozos designados. Se mezcló la solución inclinando suavemente de lado a lado varias veces, asegurando que la solución cubriera el fondo del pozo de manera uniforme, se cubrió la placa de la tira con Parafilm M y se incubó a 37°C durante 90 min. Se retiró la solución de reacción de unión de cada pocillo. Se lavó cada pocillo tres veces pipeteando en cada uno 150  $\mu$ L del Tampón de lavado diluido ME1 1X. Luego se retiró de los pozos y se desechó, repitiendo el paso para un total de tres lavados.

#### Captura de ADN metilado

Se diluyó ME5 (a dilución 1: 1000) con ME1 diluido, se agregó 50  $\mu$ L de ME5 diluido a cada pocillo, luego se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 60 min., se retiró la solución diluida de ME5 de cada pozo, se lavó cada pocillo tres veces con 150  $\mu$ L de tampón de lavado diluido ME1 1X. Se diluyó ME6 (a dilución

1: 2000) con el ME1 diluido, se agregó 50  $\mu$ L de ME6 diluido a cada pocillo, luego se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 30 min, se retiró la solución diluida de ME6 de cada pocillo, se lavó cada pocillo cuatro veces con 150  $\mu$ L de tampón de lavado diluido ME1 1X. Se diluyó ME7 (a dilución 1: 5000) con el ME1 diluido, se agregó 50  $\mu$ L de ME7 diluido a cada pocillo, luego se cubrió con papel Parafilm e incubó a temperatura ambiente durante 30 min, se retiró la solución diluida ME7 de cada pozo, se lavó cada pocillo cinco veces con 150  $\mu$ L de tampón de lavado diluido ME1 1X.

#### Detección de señal

Se agregó 100  $\mu$ L de ME8 a cada pozo e incubó a temperatura ambiente durante 1 a 10 minutos lejos de la luz. Se comenzó a monitorear el cambio de color en los pocillos de muestra y los pozos de control. La solución ME8 se volvió azul en la presencia de suficiente ADN metilado. Se agregó 100  $\mu$ L de ME9 a cada pocillo para detener la reacción de la enzima cuando cambiaron el color en los pocillos de control positivo a azul medio. Se mezcló la solución agitando suavemente el marco y se esperó entre 1-2 minutos para permitir que la reacción de color se haya detenido completamente. El color cambió a amarillo después de agregar ME9 y la absorbancia se leyó en un lector de microplacas a 450 nm en los primeros 15 min.

#### Cálculo de 5-mC

Para cuantificar la cantidad absoluta de ADN metilado utilizando un cálculo de precisión, primero se generó una curva estándar y se trazaron los valores de OD frente a la cantidad de ME4 en cada punto de concentración. A continuación, se determinó la pendiente (OD / ng) de la curva estándar usando regresión lineal (con las funciones de regresión lineal de Microsoft Excel) y la parte más lineal (al menos 4 puntos de concentración, incluido el punto 0) de la curva estándar para el cálculo óptimo de la pendiente. Se calculó la cantidad y el porcentaje de ADN metilado (5-mC) en el ADN total utilizando lo siguiente:

$$5 - mC(\text{ng}) = \frac{OD_{\text{muestra}} - OD_{\text{ME3}}}{\text{pendiente} * 2}$$

$$5 - mC(\%) = \frac{\text{Cantidad de } 5 - mC(\text{ng})}{\text{Cantidad de ADN}} * 100$$

La cantidad de ADN metilado es proporcional a la cuantificación absoluta de 5-metilcitosina (5mC) usando una curva estándar, que se puede crear con el Control positivo (polinucleótido metilado que contiene 50% de 5-mC) y el Control negativo (polinucleótido no metilado que contiene un 50% de citosina).

Para la evaluación del porcentaje de metilación de ADN en cada participante, se realizó la correspondiente curva de calibración, cuyos promedios se muestran en la figura 9, dando una línea de tendencia lineal con la ecuación  $y = 0.041x + 0.0295$  y un valor de  $R^2 = 0.9311$ .

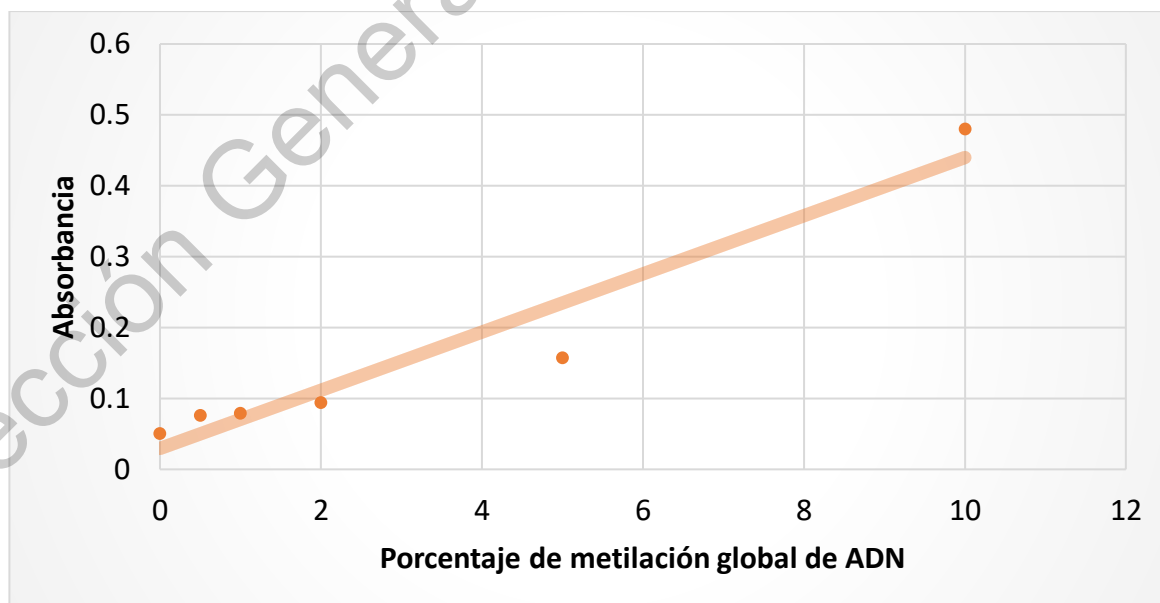


Figura 9. Curva de calibración del porcentaje de metilación global de ADN.

### 5.2.7 Análisis estadístico

Se evaluó el comportamiento de los datos obtenidos de cada grupo, empezando por la normalidad que fue analizada mediante Kolmogorov-Smirnov y Shapiro–Wilk lo que arrojó un resultado de distribución no normal, por lo tanto, se evaluaron como medidas no paramétricas.

Se hizo el análisis estadístico usando el paquete informático estadístico GraphPad prism 8 software. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y la determinación de correlación por el coeficiente de correlación de Spearman.



## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Características de la población

Los resultados del cuestionario de tabaquismo aplicado a los participantes aceptados en el estudio, mencionaron la autodenominación de cada uno, los cuales fueron clasificados en grupos de no fumador, fumador activo, fumador pasivo y paciente con cáncer pulmonar con 10, 7, 9 y 4 integrantes, respectivamente (ver figura 10).

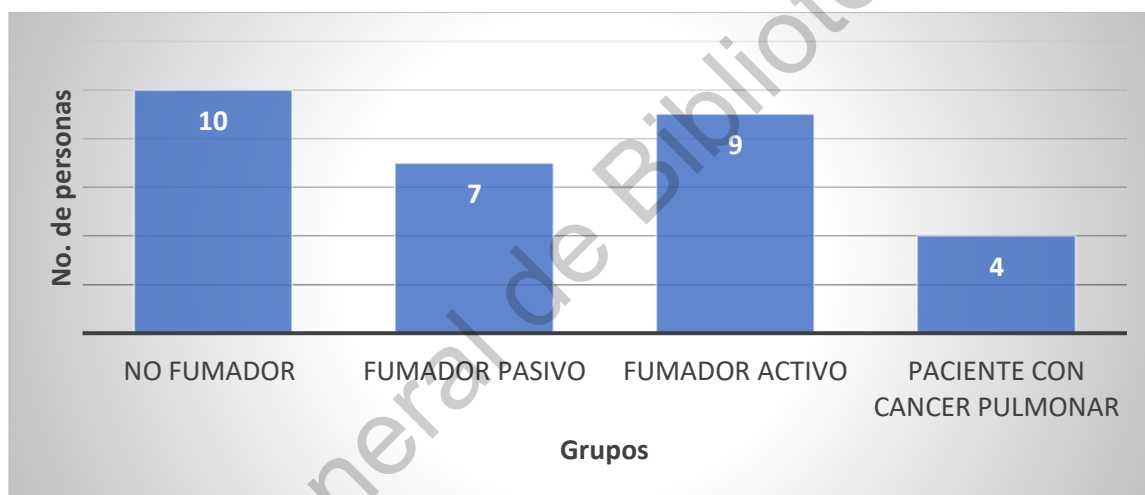


Figura 10. Conformación de los grupos de estudio.

Durante el reclutamiento de voluntarios, se dificultó particularmente la colaboración de fumadores pasivos y pacientes con cáncer pulmonar. En el caso de fumadores pasivos, a pesar de instruir las características de estos, la mayoría de las personas no se autodenominaban como tal o les era difícil identificar conscientemente el tiempo de exposición al humo del tabaco prefiriendo quedarse fuera del estudio. Esto podría atribuirse que incluso personas que no conviven frecuente y conscientemente con fumadores activos, se encuentran expuestos al humo del tabaco en lugares públicos a pesar de haberse impuesto la ley antitabaco

en nuestro país. Hecho que coincide con otros lugares como es el caso de Barcelona, donde se ha comprobado que la prevalencia de exposición al humo de tabaco por segunda mano, es decir, de forma pasiva, fue disminuida en el hogar y lugares de trabajo luego de aplicar la ley 28/2005 de medidas sanitarias frente al tabaquismo, sin embargo, también se hace énfasis en que casi la mitad de la población sigue expuesta al humo de tabaco, de segunda mano, durante el tiempo libre (Manzanares-Laya, Lopez, Sanchez-Martinez, Fernandez, & Nebot, 2011; Villalbi, 2009). Para poder definir a la población de manera sensible y específica, se requiere de la medición a la exposición al humo del tabaco, desafortunadamente, los valores de cotinina sérica a pesar de ser el metabolito más usado para medir la exposición al humo del tabaco, no podrían ayudarnos a llevar a cabo la clasificación para determinar los grupos de estudio, ya que el catabolismo de la nicotina varía de acuerdo a la capacidad metabólica de cada individuo, lo que para un resultado altamente sensible, se sugiere tomar en cuenta las variables genéticas y complementar con una análisis molecular especialmente de CYP2A6, enzima que se encarga de metabolizar la nicotina (Pianezza et al., 1998).

En el caso de los pacientes con cáncer de pulmón, más del 30% de voluntarios desistieron durante el procedimiento dado a los efectos secundarios de las quimioterapias y radioterapias recibidas, indicando que no se encontraban dispuestos a continuar con el proceso de evaluación tanto verbal como químico. Además, se identificaron un par de defunciones durante el periodo de recolección imposibilitando la continuidad del procedimiento. Estas determinantes en el estudio reflejan una parte de la tasa de mortalidad y población susceptible que se encuentra en la zona centro – norte de nuestro país (Franco-Marina & Villalba-Caloca, 2001).

Con respecto al género, se identificó que, en el grupo de no fumadores, el 60% son mujeres, en los fumadores pasivos el 85%, en fumadores activos el 22%

y de los pacientes con cáncer pulmonar el 75%, mientras que los varones ocupan el 40, 15, 78 y 25% respectivamente, cuyos datos son mostrados en la figura 11.

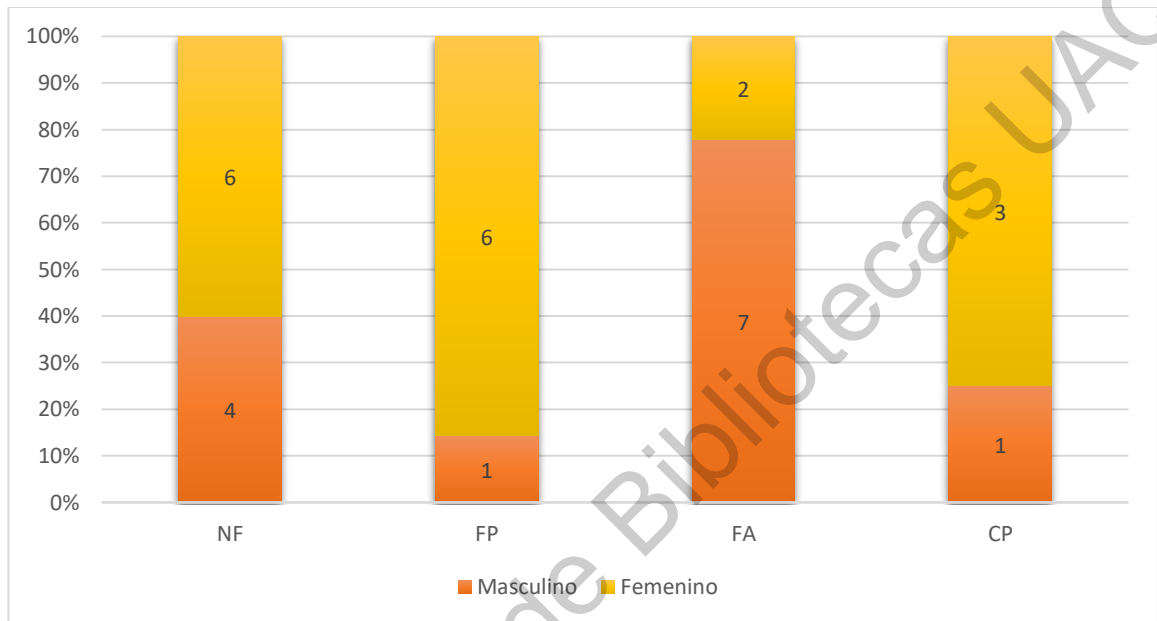


Figura 11. Exposición al humo del tabaco según el género.

En la población con cáncer pulmonar destacan mujeres que nunca han fumado, estos datos que coinciden con otras investigaciones alternas a esta que han alertado a investigadores poniéndose como objetivo el análisis molecular en estos casos en particular. Dentro de los descubrimientos que se han realizado, se identifican a mujeres de edad temprana comparadas al resto con el mismo diagnóstico, pero sin los factores de predisposición al mismo, lo que sugiere cierta atribución a la parte genética. Para apoyar el análisis de una forma más específica, en otro estudio con el que compartimos objetivo, se han identificado 8 genes potencialmente patógenos relacionados al cáncer: BRCA1, BRCA2, ERCC4, EXT1, HNF1A, PTCH1, SMARCB1 y TP53. Del total de mujeres analizadas, al menos 2 resultaron con 15 mutaciones patógenas (ABCC10, ATP7B, CACNA1S, CFTR, CLIP4, COL6A1, COL6A6, GCN1, GJB6, RYR1, SCN7A, SEC24A, SP100, TTN y

USH2A). Los autores de este estudio sugieren que alguno de estos genes candidatos pueden explicar la predisposición del cáncer pulmonar en los casos femeninos (Donner et al., 2018) sin embargo, el análisis puntual en cada uno de los genes no se puede considerar como una prueba definitiva para el análisis predictivo o de diagnóstico temprano de cáncer pulmonar ya que se limita a la investigación particular en mujeres.

También se ha identificado mayor susceptibilidad a aberraciones genéticas predominando en los genes como p53, CYP1A1, GSTM1 y K-Ras así como la formación de mayor cantidad de aductos de ADN a menor exposición al humo del tabaco (Erazo, Amigo, Oyarzún, & Peruga, 2008). Apoyando en el mismo sentido, se ha determinado que los factores genéticos son de gran peso ante el diagnóstico de esta enfermedad ya que de este depende la respuesta a factores ambientales y la susceptibilidad a carcinógenos (Hung et al., 2019). Dadas las características de dichos genes, se podrían tomar en cuenta como un mapeo tanto para varones como para mujeres con el afán de complementar un perfil genético que, en conjunto con las evaluaciones epigenéticas como la metilación global de ADN, podrían atribuir al monitoreo o al diagnóstico temprano de cáncer pulmonar en fumadores pasivos, activos y no fumadores.

En lo que respecta a la evaluación por grupo, para poder llevar a cabo el análisis estadístico fue necesario identificar la distribución de los datos y así poder aplicar test adecuados para la evaluación de los mismos. En este estudio se analizó el comportamiento de los resultados con ayuda del test Kolmogorov-Smirnov y Shapiro–Wilk que nos indica una distribución no normal de los datos, por esto se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para corroborar que no existe diferencia significativa ( $p=0.254$ ) entre las edades de los grupos de no fumadores (NF), fumadores activos (A), fumadores pasivos (P) y pacientes con cáncer pulmonar (C), cuyos promedios fueron 59.4, 55.3, 55.7 y 66.5, respectivamente( ver figura 12).

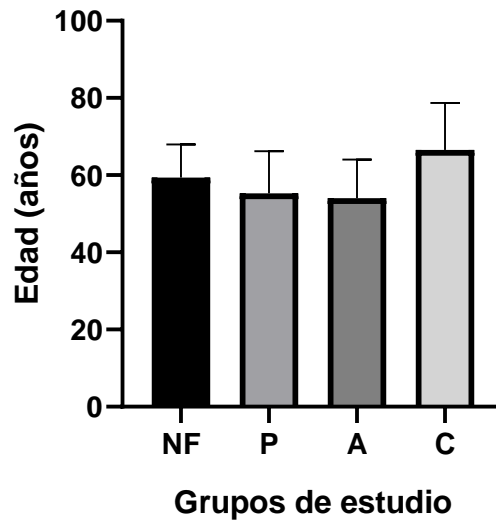


Figura 12. Comparaciones de la edad entre los grupos de estudio.

NF: no fumadores, P: fumadores pasivos, A: fumadores activos y C: pacientes con cáncer de pulmón. Prueba Kruskal-Wallis con  $\alpha > 0.05$ .

Desde otro enfoque, se observó que el género y la edad son factores importantes en el desarrollo de cáncer pulmonar, puesto que nuestro grupo de pacientes con cáncer de pulmón está conformado con un 75% de mujeres mayores a 55 años de edad. Dicho análisis también se ha reflejado en estudios de casos y controles y de cohorte pero presentando variabilidad en la asociación de género y probabilidad de padecer cáncer de pulmón. En los estudios de casos y controles, las mujeres presentan valores de odds ratio mayores que los hombres a un mismo nivel de exposición, en cambio en los de cohorte, los riesgos para las mujeres son menores que para los hombres, esta variabilidad se le atribuye a un posible sesgo por subreporte de exposición al tabaquismo activo y a un efecto contundente del tabaquismo pasivo que podría ser mayor en los hombres (Erazo et al., 2008).

De acuerdo a un estudio retrospectivo donde dividieron el total de su población en 3 grupos: <49 años, de 50 a 69 años y >70 años, cuyos porcentajes de población abarcan el 12.6, 59, y 28.4%, respectivamente (Serrano-Olvera, 2009), tomando en

cuenta que el promedio del primer grupo fue de 43.2 años. Por lo anterior comprobamos que los 4 grupos de estudio no presentaron variabilidad significativa en cuanto a la edad, ya que es importante mantener la homogeneidad para el análisis de este estudio dado a que la edad es un factor muy importante para el diagnóstico de cáncer de pulmón y está estrechamente relacionado con el aumento de metilación global de ADN (Serrano-Olvera, 2009).

## 6.2 Resultados obtenidos por grupo

El grupo de no fumadores presentó una edad promedio de 59.4 años, donde solamente 1 persona afirma estar expuesta al humo del cigarro de forma pasiva durante 30 minutos por semana, en solo algunas semanas. Con respecto a las concentraciones de cotinina, se obtuvo un promedio de 1.24 ng/mL, mientras que el promedio del porcentaje de metilación de ADN fue de 3.31.

Dado que la parte hereditaria es relevante para el estudio, se obtuvieron datos de antecedentes oncológicos de familiares cercanos al participante, de los cuales el 30% del grupo menciona por lo menos a 1 familiar con cáncer. Los tipos de cáncer mencionados fueron mieloma múltiple, mama, linfático y de próstata, datos que se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Características del grupo de no fumadores.

Dx por test	Edad	Exposición al humo del cigarro (horas)	Cotinina ng/mL	Metilación de ADN %	Familiar con Ca	Parentesco	Tipo de Cáncer
NF	49	0	1.3	5.50	no	na	na
NF	70	0	0.1	4.33	no	na	na
NF	61	0	0.3	2.49	si	Madre y hermana	mieloma múltiple y mama
NF	48	0	1.1	1.78	no	na	na
NF	74	0	1.3	2.51	no	na	na
NF	52	0	0.8	3.71	no	na	na

NF	65	30 min por semana	2.4	3.22	no	na	na
NF	60	0	2.4	3.80	no	na	na
NF	57	0	1.8	3.41	si	Hermana	Linfático
NF	58	0	0.9	2.36	si	Padre	Próstata

NF: no fumadores, Ca: cáncer, na: no aplica.

En el caso de los fumadores pasivos (tabla 7), se indica una edad promedio de 55.3 años, de los cuales, 2 personas indican la convivencia de 24 horas diarias con fumadores constantemente activos, mientras que el resto oscila de 3 horas por semana hasta 7 horas al día. En cuanto a cotinina sérica, se obtuvo un promedio de 1.45 ng/mL, y del porcentaje de metilación de ADN fue de 2.49.

Mientras que el 85.7% del mismo grupo de no fumadores menciona a 1 familiar directo con antecedentes oncológicos, específicamente en mama, ojo, garganta, estómago y matriz.

Tabla 7. Características del grupo de fumadores pasivos.

Dx por test	Edad	Exposición al humo del cigarro	Cotinina ng/mL	Metilación de ADN %	Familiar con Ca	Parentesco	Tipo de Cáncer
P	46	6 horas al día	1.2	1.667	si	Padre	ojo
P	43	1 hora al día	2.2	1.85	si	Tía	mama
P	52	3 horas por semana	1.9	2.39	si	Hermano	Garganta
P	54	todo el día	1.6	2.97	si	Padre	Estómago
P	73	3 horas, no diario	0.9	2.99	no	na	na
P	52	7 horas al día	1.2	3.14	si	Abuela paterna	mama
P	67	todo el día	1.2	2.48	si	Abuela paterna	Matriz

P: fumadores pasivos, Ca: cáncer, na: no aplica.

El grupo de los fumadores activos (tabla 8), refleja una edad promedio de 54 años, cuya ingesta de cigarros por día van de 2 hasta 20 con un promedio de 8.8 cigarros por día. Este grupo en específico reflejó un promedio de 3.7 ng/mL de cotinina sérica, y 1.95 de promedio en el porcentaje de metilación de ADN.

Dentro de los antecedentes oncológicos familiares, únicamente el 33.3% refiere al menos a un familiar con diagnóstico de cáncer, los tipos mencionados son de mama, próstata o vejiga.

Tabla 8. Características del grupo de fumadores activos.

Dx por test	Edad	Exposición al humo del cigarro (cigarros al día)	Cotinina ng/mL	Metilación de ADN %	Familiar con Ca	Parentesco	Tipo de Cáncer
A	41	2	1.2	2.87	si	Tía	mama
A	59	3	1.1	3.10	si	Abuelo paterno y padre	Desconoce
A	67	2	1.2	2.18	no	na	na
A	46	6	1	2.30	no	na	na
A	57	8	1	2.76	no	na	na
A	49	7	1.1	0.08	no	na	na
A	69	12	7.4	2.06	no	na	na
A	55	20	11.6	2.19	no	na	na
A	43	20	7.7	0.04	si	Padre	Próstata y vejiga
A	41	2	1.2	2.87	si	Tía	mama

A: fumadores activos, Ca: cáncer, na: no aplica.

En cuanto al grupo de los pacientes con cáncer pulmonar (tabla 9), se indica una edad promedio de 66.5 años, de los cuales el 50% menciona nunca haber estado expuesto al humo del tabaco de manera frecuente, mientras que el resto indican ser fumadores pasivos o exfumadores. En este grupo, la concentración



promedio de cotinina sérica fue de 0.45 ng/mL, mientras que el promedio del porcentaje de metilación de ADN fue de 1.58%.

El 50% afirmó tener por lo menos 2 familiares con antecedentes oncológicos, de los cuales destacan cáncer de mama, pulmón, próstata, huesos y mieloma múltiple.

Tabla 9. Características del grupo de pacientes con cáncer pulmonar.

Dx por test	Edad	Exposición al humo del cigarro (horas)	Cotinina ng/mL	Metilación de ADN %	Familiar con Ca	Parentesco	Tipo de Cáncer
C	84	0	0.6	0.95	Si	Padre, hermanos y sobrinos	Pulmón, próstata, mama, huesos
C	56	menos de 1 hora al día	0.1	1.91	Si	Madre, tía paterna	Mieloma múltiple, desconocido
C	65	0	0.3	2.49	no	na	na
C	61	ex fumador de hace 14 años	0.8	0.98	no	na	na

C: pacientes con cáncer de pulmón, Ca: cáncer, na: no aplica.

A pesar de que los integrantes se autodenominaron como no fumadores, fumadores pasivos y fumadores activos, las concentraciones de cotinina en suero en cada individuo refleja cierta variabilidad. En los no fumadores, donde se estimaban concentraciones bajas, se encontraron concentraciones altas características de fumadores activos; en el caso de fumadores pasivos, se encontraron tanto valores bajos estimados para no fumadores como valores altos estimados para fumadores altamente activos, lo que sugiere que, a pesar del aparente control sobre el consumo de tabaco en lugares públicos, aún continúa la alta exposición al humo del tabaco de manera involuntaria e inconsciente (Bello, Michalland, Soto, Contreras, & Salinas, 2005).

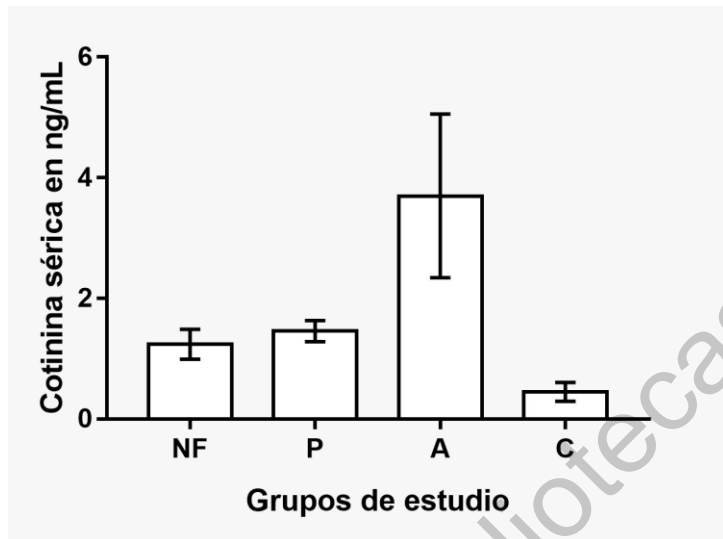


Figura 13. comparación de cotinina sérica entre grupos de estudio.

NF: no fumadores, P: fumadores pasivos, A: fumadores activos y C: pacientes con cáncer de pulmón. Prueba Kruskal-Wallis con  $\alpha < 0.05$

Después de realizar el análisis estadístico mediante Kruskal-Wallis para comparar las concentraciones de cotinina sérica entre grupos, se encontró diferencia significativa con una  $p = 0.032$ , mientras que para el procedimiento de comparación múltiple por pares se utilizó el método de Dunn que nos muestra la diferencia significativa únicamente entre los grupos de fumadores activos y el de pacientes con cáncer pulmonar ya que estos son el grupo de menor exposición al humo del tabaco. La ausencia de diferencia estadística significativa entre el resto de grupos podría ser atribuida a las características en variabilidad genética, así como al tiempo transcurrido a la última exposición al humo del tabaco y a la toma de muestra.

Cabe destacar que la evaluación de cotinina además de ser el biomarcador más utilizado y el de mejor estimación, también maneja ciertas propiedades que pudieran estar dando valores ligeramente alterados, ya que el pico más alto de la cotinina en sangre se alcanza entre la primera y segunda hora luego de la

exposición al humo del tabaco tanto pasiva como activamente (Trullén, Bartolomé, Barrueco, Herrero, & Jiménez, 2006), sin embargo, no se realizó la toma de muestra en este periodo de tiempo por la inaccesibilidad de tiempos de cada participante, especialmente de los fumadores pasivos.

Por otro lado, es importante tomar en cuenta que la variabilidad en el metabolismo de cada individuo genera sesgos en el análisis, ya que hay organismos que metabolizan la nicotina en cotinina a velocidades más rápidas que otros, así también su eliminación del organismo, lo que argumenta los diferentes niveles de adicción (Fuentes-Pila, García, Calatayud, & Pereira, 2007; Murphy, 2016; Park et al., 2018). Por tal motivo es asumible que existan fumadores pasivos con niveles bajos de cotinina, considerando el tiempo transcurrido del último momento de exposición pasiva al humo del tabaco, al momento de la toma de muestra sanguínea (Muscat, Stellman, Caraballo, & Richie, 2009) lo que explicaría la variabilidad de cotinina en cada uno de los individuos fumadores activos.

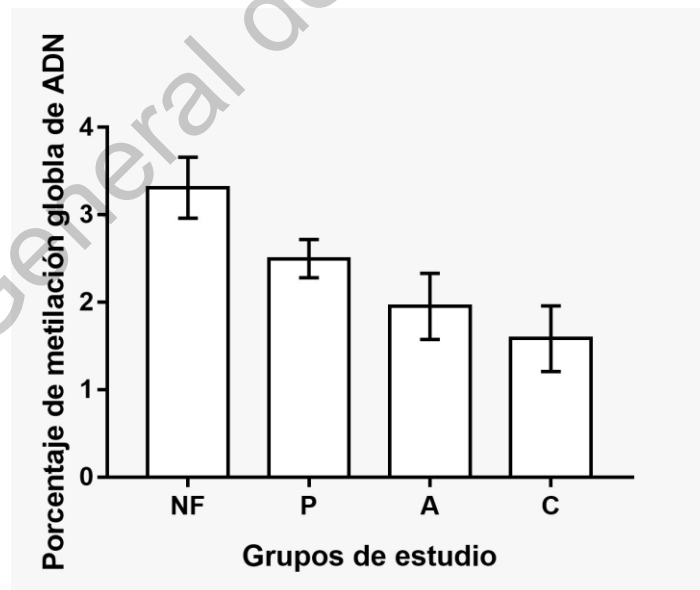


Figura 14. Comparación del porcentaje de metilación global de ADN entre grupos de estudio.

NF: no fumadores, P: fumadores pasivos, A: fumadores activos y C: pacientes con cáncer de pulmón. Prueba ANOVA de una vía con  $\alpha < 0.05$

Después de realizar el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía para comparar los porcentajes de metilación global del ADN entre grupos, se encontró diferencia significativa con una  $p= 0.012$ , mientras que para el procedimiento de comparación múltiple por pares se utilizó el método de Student-Newman-Keuls que nos muestra la diferencia significativa entre los grupos de no fumadores y el de pacientes con cáncer pulmonar; no fumadores y fumadores activos.

Dada las características de la metilación del ADN, la relación con la edad (Iriarte, Fontes, & Méndez-López, 2015) y esta a su vez con el cáncer de pulmón, se ha determinado dicha evaluación como un biomonitor candidato para evaluar el deterioro o envejecimiento del ADN que también va de la mano con mutaciones que desembocan en carcinogénesis y en este caso en específico, tumoraciones pulmonares. Además, se ha demostrado que la capacidad de metilación y restauración del ADN es heredable, lo que explica la alta probabilidad de carcinogénesis en la descendencia de pacientes con historial oncológico. Esto convoca a evaluaciones como la aceleración epigenética intrínseca de la edad (IEAA) basadas en datos de metilación, como candidato a biomarcadores que predicen la incidencia de cáncer de pulmón (Levine et al., 2015).

Si nos basamos en lo anterior, los porcentajes de metilación de ADN obtenidos en el grupo de pacientes con cáncer pulmonar serían valores contrarios a los esperados, es decir, se esperaría un alto porcentaje de metilación global dada a las edades de nuestros pacientes; sin embargo, se encuentran con porcentajes de metilación incluso más bajos que nuestro grupo control, es decir, los no fumadores. Estos resultados se les atribuyen a los cambios en expresión genética que lleva a cabo una célula que deja de ser diferenciada para convertirse en una célula cancerígena, es decir, cuando no hay suficiente metilación, diversos genes son expresados para sintetizar diferentes proteínas, que, en el caso de la carcinogénesis, se sobre expresan todos aquellos genes involucrados en el ciclo celular, proliferación, evasión de apoptosis, etcétera (Guardiola et al., 2016) sin embargo, el presentar un porcentaje de metilación global de ADN bajo en el caso

de los pacientes con cáncer pulmonar, no significa que también los genes supresores de tumores se encuentren activos, entonces es aquí donde también entra un porcentaje en regiones específicas de ADN que podrían comprobarse con un mapeo de metilación por regiones y comprobar los genes que se encuentran silenciados.

Identificamos que solamente el 50% de los pacientes con cáncer de este estudio tienen familiares con antecedentes oncológicos. Haciendo un contraste con otro estudio cuya n fue de 183, coincide que aproximadamente el 50% de pacientes con cáncer pulmonar (39.1 - 51.9%) no tienen familiares con historial de neoplasias, mientras que el resto del porcentaje son positivos a cáncer en algún tejido en particular o desconocidos (Serrano-Olvera, 2009). Estos resultados nuevamente sugieren la intervención de diferentes factores como los hábitos alimenticios, el tabaquismo, además de los factores genéticos y epigenéticos. Así mismo en población mayor a 30 años ingresada en un hospital de Japón se llevó a cabo el análisis de antecedentes familiares en 1733 casos y 6643 controles identificando que de acuerdo a la histología y el tipo de parientes afectados oncológicamente, se asoció significativamente con un mayor riesgo de adenocarcinoma femenino con un OR= 1.72 que asociada a tabaquismo se limitaba a los fumadores (Yoshida et al., 2019).

Tal es la magnitud de intervención que tiene la genética en pacientes con cáncer de pulmón que, en una población de 410 pacientes con dicho diagnóstico, específicamente de células no pequeñas, se identificaron a 192 con familiares con antecedentes de cáncer de pulmón. Del total, 67 pacientes mostraron tener reordenamiento genético de los cuales 51 presentaban fusiones EML4-ALK y 16 fusiones ROS. La tasa de fusión genética más alta ocurrió en pacientes con antecedentes familiares de cáncer de pulmón, alta exposición al humo de tabaco y al humo de la combustión del carbón. Particularmente las fusiones de ALK y el reordenamiento genético en total se asoció con mujeres jóvenes sin antecedentes de tabaquismo, con exposición al humo del carbón y con antecedentes familiares

de cáncer pulmonar (Chen et al., 2019). El estudio mencionado sirve como ejemplo de ampliación de este trabajo de investigación ya que se requiere de analizar puntalmente las aberraciones presentadas en nuestros participantes para complementar el estudio.

Asimismo, en otro estudio, dentro de la identificación de los genes afectados por la metilación aberrante en el proceso del cáncer pulmonar se encuentran p16, DAP-K, GSTP1 y MGMT; encontrando también hipermetilación en el promotor del gen APC en 96% de los casos estudiados (Jiménez Massa, 2012). Del mismo modo, se ha determinado que la metilación diferencial relacionada con el tabaquismo se asocia con la expresión génica en el tejido pulmonar, sugiriendo así las evaluaciones dirigidas (M. K. Lee, Hong, Kim, London, & Kim, 2016).

### **6.3 Correlación entre concentraciones de cotinina sérica y el porcentaje de metilación global de ADN**

A continuación, en la figura 15, se muestran la correlación de Spearman realizada en cada uno de los grupos entre los valores obtenidos del porcentaje de metilación global de ADN y la concentración de cotinina sérica. En todos los casos no hubo correlación; a) en no fumadores (NF) entre el porcentaje de metilación global de ADN y las concentraciones de cotinina sérica con una  $P=0.7632$  y  $r=0.1098$ ; b) en fumadores pasivos (P) con una  $P= 0.2952$  y  $r=0.481$ ; c) en fumadores activos (A) con una  $P=0.2199$  y  $r=0.4557$  y en d) en pacientes con cáncer pulmonar (C) con una  $P=0.4267$  y  $r=0.6$ .

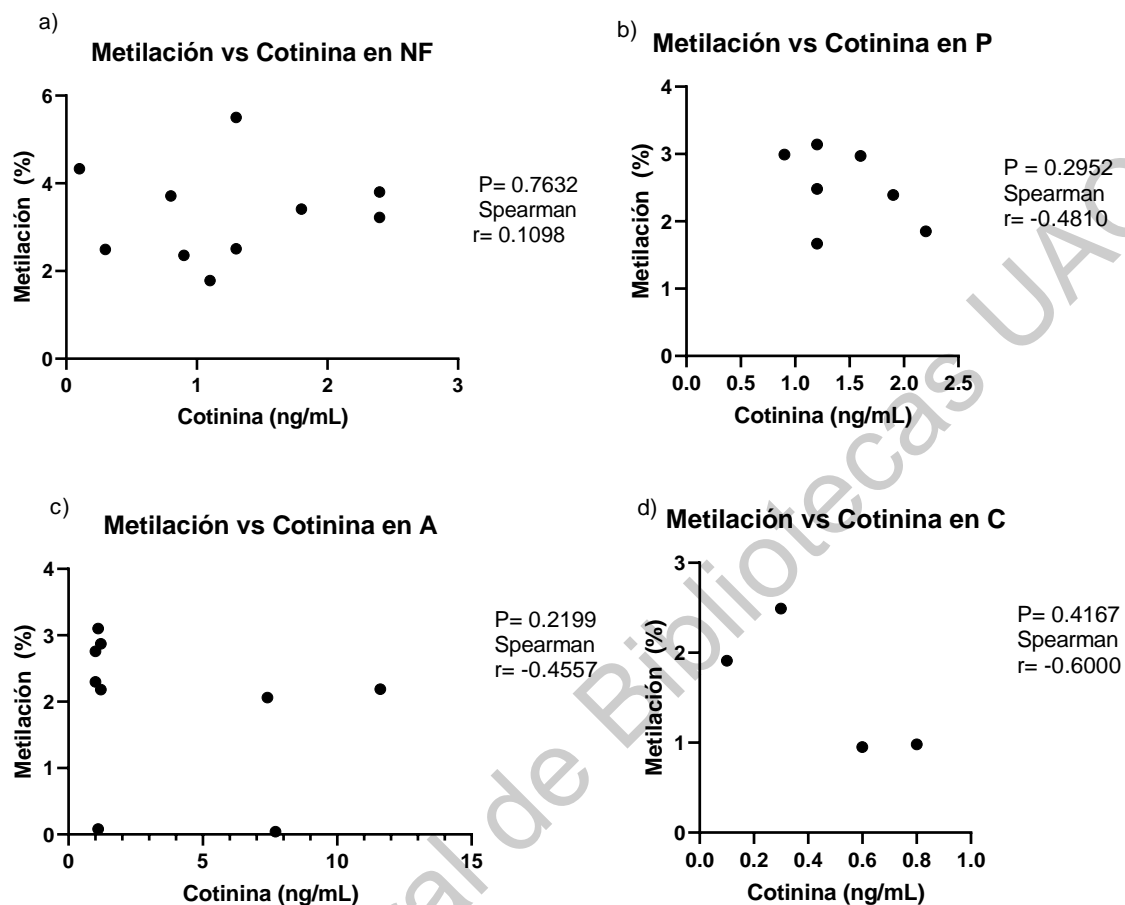


Figura 15. Correlación de metilación con cotinina sérica por grupo.

NF: no fumadores, P: fumadores pasivos, A: fumadores activos y C: pacientes con cáncer de pulmón. Correlación de Spearman con  $\alpha < 0.05$ .

De acuerdo con los valores estadísticos presentados en este proyecto, no existe correlación significativa entre la concentración de cotinina sérica y el porcentaje de metilación global del ADN. Dicho análisis se realizó con el objetivo de asociar el consumo de tabaco o el grado de exposición al humo de este con el porcentaje de metilación global de ADN y utilizarlos como biomonitores, sin embargo, desde un ángulo más preciso, se ha identificado la correlación entre los niveles de cotinina y la metilación en regiones específicas del ADN que incluso

están relacionados con el mismo metabolismo de la nicotina como es el gen CYP2A6. De este estudio se identificaron en total 19 SNP en el gen CYP2A6 asociados al metabolismo de cotinina, dejando a la metilación como el mediador molecular por la modulación dinámica que permite la activación de genes, esto permite la variación genética, por ende, los distintos niveles de cotinina, oponiéndose así, a la idea de una intervención directa entre la nicotina y el ADN (Gupta et al., 2019).

En otro sentido, con el objetivo de mejorar los biomarcadores que evalúen la exposición al humo del tabaco, se ha determinado y comprobado ante la cotinina sérica, una relación con los niveles de metilación específica en cg05575921 ubicado en el gen represor del receptor de hidrocarburos de arilo (AHRR), que, como se menciona en los antecedentes de este proyecto, es uno de los protagonistas para la introducción de carcinógenos al ADN y con la formación de aductos, se generen mutaciones genéticas. La desmetilación de dicho locus, residuo de CpG, se considera un factor de riesgo independiente para el cáncer de pulmón luego de ajustar el estado de tabaquismo (Andersen, Philibert, Gibbons, Simons, & Long, 2017; Baglietto et al., 2017; Fasanelli et al., 2015; Reynolds et al., 2017).

#### **6.4 Correlación entre la edad y el porcentaje de metilación global de ADN**

En la figura 16, se indica que no existe correlación en ninguno de los grupos de estudio en cuanto a edad y porcentaje de metilación global se refiere, ya que presentan valores de a)  $P= 0.9184$  y  $r=0.04242$ , b)  $P= 0.123$  y  $r= 0.6487$ , c)  $P>0.999$



y  $r=0.0$  y d)  $P= 0.75$  y  $r= -0.4$  en no fumadores (NF), fumadores activos (A), fumadores pasivos (P) y pacientes con cáncer pulmonar (C), respectivamente.

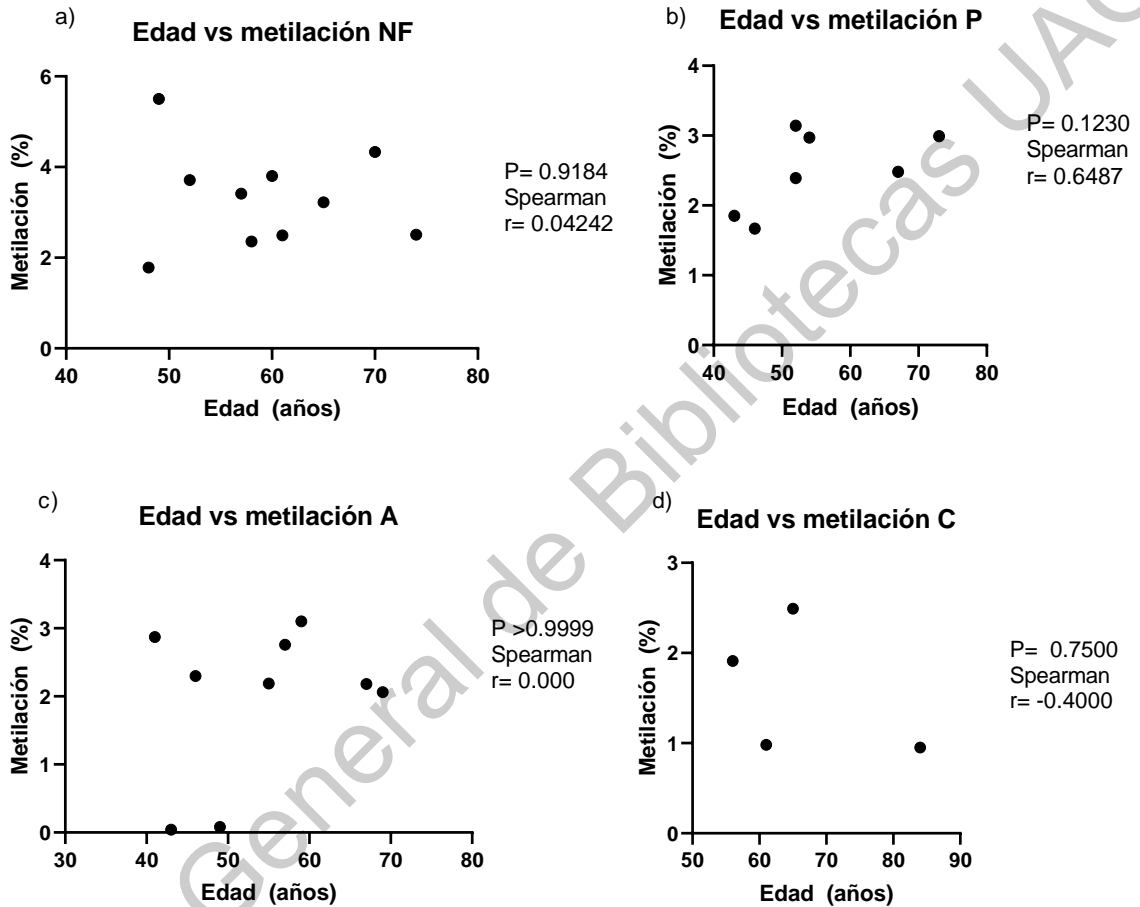


Figura 16. Correlación entre la edad y el porcentaje de metilación global de ADN por grupo.

NF: no fumadores, P: fumadores pasivos, A: fumadores activos y C: pacientes con cáncer de pulmón. Correlación de Spearman con  $\alpha < 0.05$ .

Está determinada la relación del aumento del porcentaje global de metilación del ADN con respecto a la edad ya que este mecanismo tiende a acumular grupos metilo, es decir, se encuentra menor porcentaje de metilación global en adultos

jóvenes que en personas de la tercera edad y es tal su asociación que se ha determinado un mejor predictor a enfermedades relacionadas con el envejecimiento que la misma longitud de telómeros, especialmente en la metilación de ADN en la longitud de telómeros (DNAmTL) (Lu et al., 2019). Sin embargo, en nuestro estudio no se ha encontrado una correlación significativa a pesar de que el rango de edad seleccionado es relativamente amplio. Esto podría atribuirse a los hábitos alimenticios y exposiciones a diversos carcinógenos como los contenidos en el humo del tabaco, así como la susceptibilidad genética y capacidad de regeneración en el ciclo celular, así como el aumento de exposición a contaminantes ambientales principalmente en zonas urbanas como la ciudad de Querétaro. Estos resultados apoyan la relación entre la contaminación ambiental y la metilación de ADN, ya que se ha demostrado que partículas ambientales con diámetro menores a 10  $\mu\text{m}$ , suelen tener repercusiones hasta interactuar con zonas específicas del ADN que involucran el origen de diversas enfermedades neurológicas, pulmonares, endocrinas y cardiovasculares. Dicho estudio convoca a la continuidad del análisis para determinar los mecanismos de acción e interacción de partículas ambientales con la modulación del ADN (Gondalia et al., 2019).

## 7 Conclusiones

No se pudo identificar una correlación estadísticamente significativa entre la exposición al humo del tabaco y el porcentaje de metilación global del ADN como posible factor de predisposición para el desarrollo de cáncer de pulmón. Sin embargo, a pesar de no tener diferencia estadística significativa, destacan datos de similitud (<1%) entre el porcentaje de metilación global de ADN del 50% del grupo de pacientes con cáncer pulmonar y el del 22.2% de fumadores activos, los cuales, luego de ser reforzado con otros métodos diagnósticos, podrían aportar información de gran importancia para el diagnóstico temprano de cáncer pulmonar.

## 8 Referencias

- Abel, J., & Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological chemistry*, 391(11), 1235-1248.
- Acosta Reynoso, I. M., Remón Rodríguez, L., Segura Peña, R., Ramírez Ramírez, G., & Carralero Rivas, Á. (2016). Risk factors in the lung cancer. *Correo Científico Médico de Holguín*, 20(1), 42-55.
- Acuña, M., & Román, E. (2013). Cáncer de pulmón. Guías de diagnósticas 2013. Oncología. *Hospital General de México*.
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug metabolism in the liver. *Clinics in liver disease*, 21(1), 1-20.
- Amorín Kajatt, E. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 85-92.
- Andersen, A. M., Philibert, R. A., Gibbons, F. X., Simons, R. L., & Long, J. (2017). Accuracy and utility of an epigenetic biomarker for smoking in populations with varying rates of false self-report. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 174(6), 641-650. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32555>

- Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: Wider roles in cancer progression and prevention. *BMC cancer*, 9(1), 187.
- Ansari, J., Shackelford, R. E., & El-Osta, H. (2016). Epigenetics in non-small cell lung cancer: From basics to therapeutics. *Translational lung cancer research*, 5(2), 155.
- Anttila, S., Tuominen, P., Hirvonen, A., Nurminen, M., Karjalainen, A., Hankinson, O., & Elovaara, E. (2001). CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. *Pharmacogenetics and Genomics*, 11(6), 501-509.
- Araujo, C. J. C., Fernández, F., García, F. E. M., & Sánchez, M. (2015). *Cáncer de pulmón de células no pequeñas en la era molecular, proceso de oncogénesis. Logros y perspectivas*. 62.
- Baglietto, L., Ponzi, E., Haycock, P., Hodge, A., Bianca Assumma, M., Jung, C., ... Campanella, G. (2017). DNA methylation changes measured in pre-diagnostic peripheral blood samples are associated with smoking and lung cancer risk. *International journal of cancer*, 140(1), 50-61.
- Becoña, E. (2010). 1. Evaluación de la adicción al tabaco. *Dependencia del tabaco. Manual de casos clínicos*, 15.
- Bello, S., Michalland, S., Soto, M., Contreras, C., & Salinas, J. (2005). *Effects in passive smokers of environmental tobacco smoke exposure*.

- Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob, P. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. En *Nicotine psychopharmacology* (pp. 29-60). Springer.
- Benowitz, N. L., St Helen, G., Dempsey, D. A., Jacob III, P., & Tyndale, R. F. (2016). Disposition kinetics and metabolism of nicotine and cotinine in African American smokers: Impact of CYP2A6 genetic variation and enzymatic activity. *Pharmacogenetics and genomics*, 26(7), 340.
- Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tönnies, M., Peter-Matthias, W., & Gundert-Remy, U. (2006). Characterisation of the xenobiotic-metabolizing Cytochrome P450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination. *Toxicology letters*, 164(3), 278-288.
- Bhat, S., Kabekkodu, S. P., Jayaprakash, C., Radhakrishnan, R., Ray, S., & Satyamoorthy, K. (2017). Gene promoter-associated CpG island hypermethylation in squamous cell carcinoma of the tongue. *Virchows Archiv*, 470(4), 445-454.
- Bock, K. W., & Köhle, C. (2006). Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical pharmacology*, 72(4), 393-404.
- Brown, C. M., Reisfeld, B., & Mayeno, A. N. (2008). Cytochromes P450: A structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug metabolism reviews*, 40(1), 1-100.

- Bustamante, L. M., Marin, S. J., & Cardona Arango, D. (2012). *Mortalidad por cáncer: Segunda causa de muerte del adulto mayor en Medellín, 2002-2006*.
- Casado, D. I. (2008). *Cáncer de pulmón microcítico*. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=5bfXgg9izv0C>
- Chang, J. T., Chang, H., Chen, P.-H., Lin, S.-L., & Lin, P. (2007). Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for CYP1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research*, 13(1), 38-45.
- Chen, Y., Li, G., Lei, Y., Yang, K., Niu, H., Zhao, J., ... Huang, Y. (2019). Lung cancer family history and exposure to occupational/domestic coal combustion contribute to variations in clinicopathologic features and gene fusion patterns in non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*, 10(4), 695-707. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12987>
- de Cos, J. S., Hernández, J. H., López, M. F. J., Sánchez, S. P., Gratacós, A. R., & Porta, R. R. (2011). Normativa SEPAR sobre estadificación del cáncer de pulmón. *Archivos de Bronconeumología*, 47(9), 454-465.
- Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E., & Zhao, B. (2011). Exactly the same but different: Promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicological sciences*, 124(1), 1-22.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M., & Pfeifer, G. P. (1996). Preferential Formation of Benzo[*a*]pyrene Adducts at Lung Cancer

Mutational Hotspots in *P53*. *Science*, 274(5286), 430.  
<https://doi.org/10.1126/science.274.5286.430>

Donner, I., Katainen, R., Sipilä, L. J., Aavikko, M., Pukkala, E., & Aaltonen, L. A. (2018). Germline mutations in young non-smoking women with lung adenocarcinoma. *lung cancer*, 122, 76-82.

Erazo, M., Amigo, H., Oyarzún, M., & Peruga, A. (2008). Smoking and lung cancer: Attributable risks according to gender. *Revista medica de Chile*, 136(10), 1272-1280.

Escobar, E. R., Gamino, M. N. B., Salazar, R. M., Hernández, I. S. S., Martínez, V. C., Bautista, C. F., ... Velázquez, J. A. V. (2018). National trends in alcohol consumption in Mexico: Results of the National Survey on Drug, Alcohol and Tobacco Consumption 2016-2017. *Salud Mental*, 41(1), 7-16.

Fasanelli, F., Baglietto, L., Ponzi, E., Guida, F., Campanella, G., Johansson, M., ... Naccarati, A. (2015). *Hypomethylation of smoking-related genes is associated with future lung cancer in four prospective cohorts*. *Nat Commun* 6: 10192.

Fox, S. I. (2014). *Fisiología humana (13a. Ed.)*. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=lqiHBwAAQBAJ>

Franco Tobón, Y. N., & Ramírez Botero, C. M. (2013). Benzo [a] pyrene from food and cancer. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1), 99-112.

Franco-Marina, F., & Villalba-Caloca, J. (2001). La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 14(4), 207-214.



- Freedland, J., Cera, C., & Fasullo, M. (2017). CYP1A1 I462V polymorphism is associated with reduced genotoxicity in yeast despite positive association with increased cancer risk. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 815, 35-43.
- Fuentes-Pila, J. M., García, E. L., Calatayud, P., & Pereira, R. (2007). Abordaje clínico de la dependencia a nicotina desde un enfoque sistémico-relacional. Resultados de un estudio descriptivo de serie de casos. *Adicciones*, 19(1), 69-97.
- Galofré, J., Calleja, A., Panizo, A., & Salvador, J. (2002). *Biología molecular del carcinoma de tiroides de estirpe folicular. Bases moleculares en la oncogénesis tiroidea*.
- Gazdar, A. F., & Zhou, C. (2018). 4—Lung Cancer in Never-Smokers: A Different Disease. En H. I. Pass, D. Ball, & G. V. Scagliotti (Eds.), *IASLC Thoracic Oncology (Second Edition)* (pp. 23-29.e3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52357-8.00004-4>
- Ghaffarian-Bahraman, A., Sadeghimanesh, N., Mirzaei, M., Akbarizadeh, A.-R., Omid, M., Mohammadi, H., ... Mohammadi-Bardbori, A. (2017). Inhibition of CYP1A1 by pharmaceutical drugs, omeprazol and ketoconazole as a mechanism for activation of aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 13-18.
- Gómez-de-Terreros, F. J., & Alvarez-Sala-Walther, R. (2000). Cáncer de pulmón. Trasplante Pulmonar. En J. Arias, M. Á. Aller, J. I. Arias, y I. Aldamendi, *Enfermería Médico Quirúrgica I* (pp. 119-128). Tébar.

- Gondalia, R., Baldassari, A., Holliday, K. M., Justice, A. E., Méndez-Giráldez, R., Stewart, J. D., ... Engel, S. M. (2019). Methylome-wide association study provides evidence of particulate matter air pollution-associated DNA methylation. *Environment international*, 104723.
- González, F. J., & Tukey, R. H. (2012). Metabolismo de fármacos. En L. L. Brunton, *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica (12a* (pp. 71-92). McGraw Hill México.
- Grau, P. W. (2011). El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno. Rol del hierro intracelular. *Acta Médica Peruana*, 28(3), 163-168.
- Grossman, S., & Porth, C. (2014a). Estructura y función del sistema respiratorio. En *Porth fisiopatología: Alteraciones de la salud, conceptos básicos: 9a edición* (pp. 898-927). Wolters Kluwer Health España/Lippincott Williams & Wilkins.
- Grossman, S., & Porth, C. (2014b). Neoplasia. En *Porth fisiopatología: Alteraciones de la salud, conceptos básicos: 9a edición* (pp. 160-199). Wolters Kluwer Health España/Lippincott Williams & Wilkins.
- Guardiola, M., Vallvé, J. C., Zaina, S., & Ribalta, J. (2016). Epigenética en la arteriosclerosis. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 28(2), 102-119.
- Gupta, R., Van Dongen, J., Fu, Y., Abdellaoui, A., Tyndale, R. F., Velagapudi, V., ... Loukola, A. (2019). Epigenome-wide association study of serum cotinine in current smokers reveals novel genetically driven loci. *Clinical epigenetics*, 11(1), 1.

- Gurrola-Díaz, C. M., González-Santiago, A. E., Troyo-Sanromán, R., & Mendoza-Topete, L. A. (2009). Tipos histológicos y métodos diagnósticos en cáncer pulmonar en un centro hospitalario de tercer nivel. *Gac Méd Méx*, 146(2).
- Huang, F., Chen, H., Khan, M. A., Yang, F., Wan, X., Xu, A., ... Zhang, D. (2013). CYP2A6, CYP1A1, and CYP2D6 polymorphisms in lung cancer patients from Central South China. *Medical Oncology*, 30(2), 521.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., ... Perdew, G. H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific reports*, 5, 12689.
- Hung, R. J., Spitz, M. R., Houlston, R. S., Schwartz, A. G., Field, J. K., Ying, J., ... Chen, W. (2019). Lung Cancer Risk in Never-Smokers of European Descent is Associated With Genetic Variation in the 5p15. 33 TERT-CLPTM1LI Region. *Journal of Thoracic Oncology*.
- Instituto Nacional de Cáncer. (2015). Factores de Riesgo del Cáncer. Recuperado de [www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo](http://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo)
- Iriarte, M. M., Fontes, L. P., & Méndez-López, I. (2015). Neuroepigenética: Metilación del ADN en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Medicina Clínica*, 144(10), 457-464.
- Jiménez Massa, A. E. (2012). *Cáncer de pulmón y citocinas: Variantes clínicas y genéticas*.
- Jones, M. J., Goodman, S. J., & Kobor, M. S. (2015). DNA methylation and healthy human aging. *Aging cell*, 14(6), 924-932.

- Jones, P. A., Issa, J.-P. J., & Baylin, S. (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics*, 17(10), 630.
- Joyce, B. T., Gao, T., Zheng, Y., Liu, L., Zhang, W., Dai, Q., ... Zhang, H. (2016). Prospective changes in global DNA methylation and cancer incidence and mortality. *British journal of cancer*, 115(4), 465.
- Karp, G. (2011a). Cáncer. En *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos (6a* (pp. 650-681). McGraw Hill México.
- Karp, G. (2011b). Reproducción celular. En *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos (6a* (pp. 560-604). McGraw Hill México.
- Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., & Cedar, H. (2016). DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Research*, 76(12), 3446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3278>
- Koseki, J., Konno, M., Asai, A., Colvin, H., Kawamoto, K., Nishida, N., ... Doki, Y. (2018). Enzymes of the one-carbon folate metabolism as anticancer targets predicted by survival rate analysis. *Scientific reports*, 8(1), 303.
- Krause, B. J., Castro-Rodríguez, J. A., Uauy, R., & Casanello, P. (2016). Conceptos generales de epigenética: Proyecciones en pediatría. *Revista chilena de pediatría*, 87(1), 4-10.
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). 2—DNA Methylation and Cancer. En Z. Herceg & T. Ushijima (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 70, pp. 27-56). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>
- Lee, K., Cáceres, D., Varela, N., Csendes, A., Ríos, H., & Quiñones, L. (2006). Variantes alélicas de CYP1A1 y GSTM1 como biomarcadores de

susceptibilidad a cáncer gástrico: Influencia de los hábitos tabáquico y alcohólico. *Revista médica de Chile*, 134(9), 1107-1115.

Lee, M. K., Hong, Y., Kim, S.-Y., London, S. J., & Kim, W. J. (2016). DNA methylation and smoking in Korean adults: Epigenome-wide association study. *Clinical Epigenetics*, 8, 103-103. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0266-6>

Levine, M. E., Hosgood, H. D., Chen, B., Absher, D., Assimes, T., & Horvath, S. (2015). DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative. *Aging (Albany NY)*, 7(9), 690.

Liamin, M., Boutet-Robinet, E., Jamin, E. L., Fernier, M., Khoury, L., Kopp, B., ... Sparfel, L. (2017). Benzo [a] pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. *Biochemical pharmacology*, 137, 113-124.

Liras, A., Martín, S., García, R., Maté, I., & Padilla, V. (2007). Tabaquismo: Fisiopatología y prevención. *Revista de Investigación Clínica*, 59(4), 278-289.

Liu, Q., Liu, L., Zhao, Y., Zhang, J., Wang, D., Chen, J., ... Liu, Z. (2011). Hypoxia induces genomic DNA demethylation through the activation of HIF-1 $\alpha$  and transcriptional upregulation of MAT2A in hepatoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 10(6), 1113-1123.

Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J., ... Swinnen, J. V. (2015). Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable

for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 5(5), 708.

Lu, A., Seeboth, A., Tsai, P., Sun, D., Quach, A., Reiner, A., ... Baccarelli, A. (2019). DNA methylation-based estimator of telomere length. *Aging*.

Macías Sánchez, K. L., Zazueta-Novoa, V., Mendoza-Macías, C. L., Rangel-Serrano, Á., & Padilla-Vaca, F. (2008). Epigenética, más allá de la Genética. *Acta Universitaria*, 18(1).

Manzanares-Laya, S., Lopez, M. J., Sanchez-Martinez, F., Fernandez, E., & Nebot, M. (2011). Impact of the 28/2005 Spanish smoking law on second-hand smoke exposure in Barcelona. *Gaceta sanitaria*, 25(6), 495-500.

Mejía-Ávila, Mayra Edith, Buendía-Roldán, I., Mateos-Toledo, H., Estrada-Garrido, A., Gaxiola-Gaxiola, Miguel, Vargas-Domínguez, Claudia Isabel, & Juárez-Hernández, Fortunato. (2016). Enfermedades pulmonares intersticiales asociadas al hábito tabáquico. En F. G. Juárez, *Diagnóstico y tratamiento en neumología* (pp. 339-342). Editorial El Manual Moderno.

Moreno, A. P. R., Bruges, R. E., Arboleda, A. C., & Jaramillo, L. F. (2016). Regulación epigenética en cáncer de pulmón: Implicaciones para el clínico. *Universitas Médica*, 57(3), 332-347.

Muñoz, S. P., & Pérez, S. C. (2007). *Cáncer de pulmón no microcítico*. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=-cj7R27wnh8C>

Murphy, S. E. (2016). Nicotine metabolism and smoking: Ethnic differences in the role of P450 2A6. *Chemical research in toxicology*, 30(1), 410-419.

- Murray, I. A., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: Friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, 14(12), 801.
- Muscat, J. E., Stellman, S. D., Caraballo, R. S., & Richie, J. P. (2009). Time to first cigarette after waking predicts cotinine levels. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 18(12), 3415-3420.
- Nakajima, M., & Yokoi, T. (2005). Interindividual variability in nicotine metabolism: C-oxidation and glucuronidation. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 20(4), 227-235.
- Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., & Gonzalez, F. J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23847-23850.
- Niu, Y., DesMarais, T. L., Tong, Z., Yao, Y., & Costa, M. (2015). Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radical Biology and Medicine*, 82, 22-28.
- Organización Mundial de la Salud. (2015a). Cáncer. Nota descriptiva No. 297. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2015d). Enfermedades no transmisibles. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). 10 datos sobre enfermedades no transmisibles. Recuperado de [http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable\\_diseases/es/](http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable_diseases/es/)

Organización Mundial de la Salud. (2014). 10 datos sobre el cáncer. Recuperado de <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>

Organización Mundial de la Salud. (2017). Cáncer. Recuperado de [www.who.int/topics/cancer/es/](http://www.who.int/topics/cancer/es/)

Park, S. L., Patel, Y. M., Loo, L. W., Mullen, D. J., Offringa, I. A., Maunakea, A., ... Tiirikainen, M. (2018). Association of internal smoking dose with blood DNA methylation in three racial/ethnic populations. *Clinical epigenetics*, 10(1), 110.

Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C. E., & Madrid-Marina, V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: Perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México*, 39, 451-462.

Phillips, D., Farmer, P., Beland, F., Nath, R., Poirier, M., Reddy, M., & Turteltaub, K. (2000). Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 222-233.

Pianezza, M. L., Sellers, E. M., & Tyndale, R. F. (1998). Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature*, 393(6687), 750-750.  
<https://doi.org/10.1038/31623>

Pragyan, P., Kesharwani, S. S., Nandekar, P. P., Rathod, V., & Sangamwar, A. T. (2014). Predicting drug metabolism by CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1: Insights from MetaSite, molecular docking and quantum chemical calculations. *Molecular diversity*, 18(4), 865-878.



- Rami Porta, R. (2009). Nueva clasificación TNM del cáncer de pulmón. *Archivos de Bronconeumología*, 45(4), 159-161.
- Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. (2011). *New England Journal of Medicine*, 365(5), 395-409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102873>
- Reynolds, L. M., Magid, H. S., Chi, G. C., Lohman, K., Barr, R. G., Kaufman, J. D., ... Liu, Y. (2017). Secondhand Tobacco Smoke Exposure Associations With DNA Methylation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 19(4), 442-451. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntw219>
- Rizo, P., González, A., Sánchez, F., & Murguía, P. (2015). Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evidencia Médica e Investigación en salud*, 8(1), 5-15.
- Sabido, R. C., Cicero, L. S., & Fernández, P. C. (2003). El consumo de tabaco. Desde los mayas al siglo XXI. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 16(2), 103-107.
- Sadeck, N. E., Ibrahim, B. M., & Alassal, M. A. (2014). Cytochrome P450-isoenzyme 1A1 in susceptibility to tobacco-related lung cancer. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, 22(3), 315-318.
- Sandoval, C., Vasquez, B., Souza-Mello, V., Alberto Mandarim-de-Lacerda, C., & del Sol, M. (2018). Role of Alcohol Consumption and Antioxidants on Global Methylation of DNA and Cancer. *International journal of morphology*, 36(1), 367-372.

- Serrano-Olvera, A. (2009). Supervivencia en relación con la edad en cáncer pulmonar de células no pequeñas. *Gaceta Médica de México*, 145(1), 27-36.
- Stejskalova, L., Dvorak, Z., & Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: Current state of art. *Current drug metabolism*, 12(2), 198-212.
- Thompson, J. J., & Robertson, K. D. (2017). Misregulation of DNA Methylation Regulators in Cancer. En A. Kaneda & Y. Tsukada (Eds.), *DNA and Histone Methylation as Cancer Targets* (pp. 97-124). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-59786-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59786-7_5)
- Tortora, G. J., Grabowski, S. R., Werneck, A. L., Esbérard, C. A., & Passos, M. A. F. (2002). El aparato respiratorio. En *Principios de anatomía y fisiología* (Vol. 7). Oxford University Press.
- Trullén, A. P., Bartolomé, C., Barrueco, M., Herrero, I., & Jiménez, C. (2006). Nuevas perspectivas en el diagnóstico y evolución del consumo de tabaco: Marcadores de exposición. *Prevención del tabaquismo*, 8(4), 164-172.
- Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2016). Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo [a] pireno y el desarrollo de tumores. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 19(1), 54-67.
- Veland, N., Hardikar, S., Zhong, Y., Gayatri, S., Dan, J., Strahl, B. D., ... Chen, T. (2017). The arginine methyltransferase PRMT6 regulates DNA methylation

and contributes to global DNA hypomethylation in cancer. *Cell reports*, 21(12), 3390-3397.

Villalbi, J. R. (2009). Assesment of the Spanish law 28/2005 for smoking prevention. *Revista española de salud pública*, 83(6), 805-820.

Villar, M. D. D. (2009). Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer. *Monografías de la real academia nacional de farmacia*.


Voisin, S., Eynon, N., Yan, X., & Bishop, D. (2015). Exercise training and DNA methylation in humans. *Acta Physiologica*, 213(1), 39-59.


Wei, C., Caccavale, R. J., Weyand, E. H., Chen, S., & Iba, M. M. (2002). Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung. *Cancer letters*, 178(1), 25-36.

Willis, A. J., Indra, R., Wohak, L. E., Sozeri, O., Feser, K., Mrizova, I., ... Arlt, V. M. (2018). The impact of chemotherapeutic drugs on the CYP1A1-catalysed metabolism of the environmental carcinogen benzo [a] pyrene: Effects in human colorectal HCT116 TP53 (+/+), TP53 (+/-) and TP53 (-/-) cells. *Toxicology*, 398, 1-12.

Yoshida, K., Takizawa, Y., Nishino, Y., Takahashi, S., Kanemura, S., Omori, J., ... Minami, Y. (2019). Association between Family History of Cancer and Lung Cancer Risk among Japanese Men and Women. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 247(2), 99-110.

**Anexo 1: Convenio entre el hospital general del ISSSTE y la Universidad Autónoma de Querétaro**

 **ISSSTE** INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

 **2019** AÑO DEL GOBIERNO DEL ESTADO EMILIANO ZAPATA

HOSPITAL GENERAL QUERÉTARO  
DIRECCIÓN  
COORDINACIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

**OFICIO No. 022-206/ DCEI 457 /2019**

Santiago de Querétaro, Qro., 03 de Mayo de 2019

**Asunto: ACTUALIZACIÓN DE OFICIO DE PROTOCOLO**

**DRA. KARLA ISABEL LIRA DE LEÓN**  
**Q.F.B. ALEJANDRA GUADALUPE ALCAZAR RAMOS**  
INVESTIGADORAS RESPONSABLES  
Presentes


At n.: **DR. CARLOS A. AVECILLA GUERRERO**  
ONCO-CIRUJANO DE LA UNIDAD

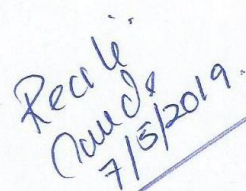
Por este conducto nos permitimos informarles **que ha sido autorizado por parte de los Subcomités de Investigación y Ética en Investigación** el trabajo de campo de su protocolo de investigación **"Determinación del grado de exposición al humo del tabaco y su asociación con factores de predisposición para el desarrollo de cáncer de pulmón"**.

Lo anterior para dar cumplimiento al Programa E015 "Investigación Científica y Tecnológica"

Sin otro particular de referencia, les enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

  
**DRA. DIANA YUDITH MIRANDA SALAZAR**  
DIRECTORA DE LA UNIDAD

  
**DR. HORACIO VARGAS SÁNCHEZ**  
SUBDIRECTOR MÉDICO Y ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA COORDINACIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

C.c.p. SUBCOMITÉS DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL GENERAL QUERÉTARO  
CONSECUTIVO  
ARCHIVO

*Recibido  
Queretaro  
7/5/2019.*

*2560100  
Ext. 50328*

Av. Tecnológico N°101 Nte.-Col. Centro - C.P. 76000  
Santiago de Querétaro, Tel. 256 01 00 Ext. 50302,050349, 50350 y 50388  
www.issste.gob.mx

## **Anexo 2: Consentimiento informado**



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Química**

### **Consentimiento Informado para la realización del estudio sobre el**

### **“Determinación del grado de exposición al humo del tabaco y su asociación con factores de predisposición para el desarrollo de cáncer de pulmón”**

Por favor, tómese el tiempo necesario para leer atentamente este documento, puede usted preguntar y comentar sobre esta prueba con cualquier persona de su confianza.

#### **Promotor del estudio**

**Nombre:** Q.F.B. Alejandra Gpe. Alcázar Ramos

**Dirigido por:** Dra. Karla Isabel Lira De León

**Centro de estudios:** Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Cerro de las Campanas S/N, CP 76010

**Maestría:** Química Clínica Diagnóstica

Le invitamos a participar en el estudio que busca cuantificar el grado de exposición al humo del tabaco mediante las concentraciones de cotinina sérica y determinar su asociación con el porcentaje de metilación global de ADN como predispositores a cáncer de pulmón; para lo cual es importante que entienda por qué es necesario éste estudio, qué va a implicar su participación, cómo se va a utilizar su información y los resultados del mismo.

**Propósito del estudio:**

El consumo de tabaco y la exposición al humo que desprende, se mantienen como la primera causa de muerte prevenible a nivel mundial; aunque se conoce poco acerca de las causas que desencadenan los cambios aberrantes que propician el cáncer; el humo del cigarrillo ha sido completamente implicado en este proceso ya que mezcla más de 7 mil sustancias químicas y al menos 70 de éstas que ocasionan cáncer en personas y animales por lo cual el objetivo es cuantificar el grado de exposición al humo del tabaco mediante las concentraciones de cotinina sérica y determinar su asociación con el porcentaje de metilación global de ADN como predispositores a cáncer de pulmón. Dicho análisis que posiblemente podría funcionar como una prueba predictiva al diagnóstico de cáncer pulmonar causado por tabaquismo, que, además de prevenir estadios avanzados de cáncer pulmonar y continuar con la elevada tasa de mortalidad, también podría prolongar la supervivencia y la calidad de la misma, así como reducir o incluso evitar costos elevados de tratamientos tanto quirúrgicos como farmacológicos.

**Resumen del estudio y participación:**

Se propone desarrollar un estudio observacional, transversal comparativo, con 4 grupos de estudios (Pacientes con cáncer pulmonar, fumadores activos, fumadores pasivos, y no fumadores), para la evaluación de la exposición al humo del tabaco y el porcentaje de metilación global del ADN.

El proceso consta de 3 etapas:

- a) Lectura y firma de este consentimiento informado.
- b) Llenado de formulario, que le tomará entre 10 y 15 minutos y se entregará junto con este documento, en el que se incluirán sus datos personales y de tabaquismo.
- c) Una toma de muestra sanguínea periférica, que es un procedimiento ambulatorio exento de riesgo, cuyas complicaciones no son mayores a un ligero dolor en el área de donde se extrajo la sangre y la posible formación

de un hematoma, en algunos pacientes, por sus características individuales, resulta difícil extraer la muestra de sangre, por lo que tal vez sea preciso puncionarle dos veces para extraer muestra de sangre suficiente.

### **Interpretación y resultados posibles de la prueba:**

Los probables resultados se explican a continuación, conocer esta información podría ayudarle a tomar decisiones sobre su salud, puesto que las investigaciones que se tienen hasta el día de hoy permiten:

Debido a que los datos buscados son de carácter cuantitativo, estos serán referenciados con los valores obtenidos en el grupo control, cuyas unidades de medida son las siguientes:

- Tabaquismo: se ajustará la medida de acuerdo con el grupo de estudio; en fumadores pasivos serán horas expuesto por día, en fumadores activos serán número de cigarros por día y en pacientes con cáncer pulmonar serán número de cigarros que solía fumar por día.
- Exposición al humo de tabaco: ng/mL.
- Metilación global del ADN: porcentaje
- No concluyente: Es una variante de un significado clínico incierto que implica que aún no existe información científica suficiente sobre el impacto que pudieran tener los cambios que se encontraron.

### **Limitaciones del estudio:**

En todos los estudios de laboratorio existen limitaciones. La interpretación clínica de sus resultados se basará en las últimas investigaciones disponibles y pudiera cambiar con el avance del tiempo y conocimiento.

### **Participación voluntaria y retirada del estudio:**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria, puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento sin que por ello se produzca perjuicio alguno. En caso de que usted decidiera abandonar el estudio puede hacerlo permitiendo el uso de los datos obtenidos hasta el momento y la utilización de las muestras biológicas para la finalidad del estudio o, si fuera su voluntad, sus muestras biológicas serían destruidas y sus datos borrados. También se le podrá retroalimentar de los resultados del estudio; su participación en el estudio le puede ayudar a un mejor conocimiento de su estado de salud.

### **Acuerdo de confidencialidad:**

Usted tiene derecho a la protección y privacidad de sus datos personales o sensibles. Ninguna persona sin autorización podrá conocer sus datos o tener acceso a ellos. La información que recojamos en esta investigación acerca de usted se mantendrá confidencial, será identificada por un número en lugar de su nombre y no será compartida ni entregada a nadie, se guardará en un archivo dentro de una cabina con llave; solo los investigadores tendrán acceso a ella.

La Dra. Berenice Lira De León, médico del equipo de investigación, será la encargada de dar a conocer los resultados personales a usted y/o a la persona autorizada por usted en este consentimiento o si así lo exigieran a las leyes mexicanas. En los resultados que se obtengan de esta investigación dados a conocer al público, no se compartirá información confidencial.



**Nombre de la persona autorizada para recibir el resultado en caso de que el paciente no pueda:**

---

**Relación con el paciente:**

---

**Destino de la muestra biológica:**

Las muestras derivadas de este estudio se almacenarán en el laboratorio de la Maestría en Química Clínica Diagnóstica de la Facultad de Química de la UAQ hasta concluir la investigación antes mencionada. El acceso a las muestras solo podrá realizarse bajo la conformidad del investigador que tiene asignada la responsabilidad de custodiarlas bajo las pautas de este documento firmado. Es importante resaltar que la información derivada de estas muestras se podrá usar para investigaciones futuras relacionadas con este proyecto.

**Aspectos éticos:**

De acuerdo al reglamento de la Ley Federal de Salud en materia de Investigación para la salud en su capítulo I y V, se cumple con los principios básicos de Bioética, de la no maleficencia, autonomía, beneficencia y justicia para con los participantes; asimismo, protegiendo la integridad, dignidad, confidencialidad y autodeterminación de su información personal, de acuerdo a lo establecido en las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos y la Declaración de Helsinki.

A cada participante se le explicará el propósito del estudio, aclarando cualquier duda o pregunta que se tenga del mismo; se le entregará el consentimiento informado, el cual leerá y firmará por duplicado entregándosele una copia del mismo.

La obligación ética de la integridad y publicación de los resultados obtenidos de este estudio transversal comparativo para establecer el grado de exposición al humo del tabaco y su asociación con factores de predisposición para el desarrollo de cáncer de pulmón, recae sobre los investigadores; los cuales someterán el protocolo antes del inicio del mismo a aprobación por parte del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro, respetando la confidencialidad y privacidad de los participantes.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Habiendo leído y entendido la información acerca del estudio que se me va a realizar, tuve la oportunidad de hacer preguntas y estas fueron aclaradas antes de firmar este consentimiento, por lo que estoy de acuerdo en que se me tome muestra de sangre para la realización de la prueba.

**Nombre y Apellidos Participante:**

---

**Quién ha informado:**

---

Acepto participar de forma voluntaria en el estudio: "Determinación del grado de exposición al humo del tabaco y su asociación con factores de predisposición para el desarrollo de cáncer de pulmón"	<b>Si</b>	<b>No</b>
He leído el consentimiento informado, comprendo los riesgos y los beneficios que implican, que mi participación es voluntaria y que me puedo retirar o solicitar que retiren mis datos y/o muestras en el momento que lo decida.	<b>Si</b>	<b>No</b>
Comprendo que mi participación en el estudio consiste en: Donar una muestra de sangre para la determinación del grado de exposición al humo de tabaco y el porcentaje de metilación global del ADN.	<b>Si</b>	<b>No</b>
Si mi muestra y datos otorgados se requieren para otro proyecto con relación a este, podrán ser utilizados.	<b>Si</b>	<b>No</b>
Doy permiso para ser informado sobre los resultados de las pruebas de este estudio y que sean relevantes para mi salud.	<b>Si</b>	<b>No</b>
Comprendo que no recibiré ningún beneficio directo por mi participación en este estudio y que no recibiré ningún beneficio económico en el futuro en el caso en que se desarrolle un nuevo tratamiento o test médico.	<b>Si</b>	<b>No</b>
Comprendo que la información del estudio será confidencial y que ninguna persona excepto los investigadores de este protocolo tendrán acceso a mis datos o a mis muestras.	<b>Si</b>	<b>No</b>
Sé cómo ponerme en contacto con los investigadores si lo necesito.	<b>Si</b>	<b>No</b>
<b>Firma participante</b>		
<b>Firma de quien ha informado:</b>		
<b>Firma de testigo 1:</b>		
<b>Firma de testigo 2:</b>		
<b>Fecha (Día/mes/año):</b>		

### Anexo 3: Cuestionario de tabaquismo



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**Formulario para la realización del estudio sobre la**

**“Determinación del grado de exposición al humo del tabaco y su asociación con factores de predisposición para el desarrollo de cáncer de pulmón”**

Este formulario se basa en el documento “Encuesta de Tabaquismo para Adultos” componente del sistema global de vigilancia epidemiológica del tabaco.

Por favor tómese el tiempo necesario para leer atentamente este documento, puede usted preguntar y comentar sobre esta prueba con cualquier persona de su confianza y/o a los investigadores.

Si alguna pregunta no le aplica escribir NA, no dejar espacios en blanco.

Tome la siguiente lista de medicamentos para contestar el punto 26.

Benzo [a] pireno-7,8-diol	Flutamida	Teofilina
Carvedilol	Haloperidol	2-(4-Amino-3-metilfenil)
Cloroquina	Ketoconazol	5-aminoflavona
Dacarbazina	Melatonina	5-fluorobenzotiazol
Debrisoquina	Omeprazol	7-etoxicumarina
Estrona	Riluzol	7-etoxiresurona
Fenacetina	Tegafur	17 $\beta$ -estradiol

1.Nombre completo:			
2.Edad:		3.Sexo: (F) (M)	
4.Dirección en el estado de Querétaro:			
5.Lugar de procedencia:			
6.Correo electrónico:			
<b>Antecedentes médicos personales</b>			
<b>Tabaquismo</b>		<b>Dieta principal</b>	
7. Cigarros por día		Por ejemplo: carbohidratos (pan, pasta, dulce, refresco)	
8. Años fumando		18. Carbohidratos por día	
9. Si no fuma actualmente ¿ha fumado alguna vez?		19. Grasas por día	
10. ¿Hace cuánto tiempo dejó de fumar?		20. Proteínas por día	
11. ¿Ha estado en contacto con personas que fuman en el último año?		21. ¿Cuántas comidas hace por día?	
12. ¿Cuántas horas al día se encuentra con personas que estén fumando?		<b>Ejercicio</b>	
<b>Alcoholismo</b>		22. Deporte que practica	
13. ¿Cuántas copas toma a la semana?		23. Horas a la semana	
14. ¿Cuántos años tiene usted consumiendo alguna bebida alcohólica?		<b>Medicamentos</b>	
<b>Enfermedades cardiovasculares</b>		24. ¿Toma algún medicamento o suplemento?	
15. Enfermedad diagnosticada		25. Menciona cuales	
16. ¿Hace cuánto tiempo fue diagnosticado?		26. Revise la lista de medicamentos especiales anexa y mencionar si toma alguno, dosis y por cuanto tiempo lo ha consumido	
<b>Diabetes</b>			
17. ¿Hace cuánto tiempo fue diagnosticado?			

<b>Antecedentes familiares</b>			
27. ¿Algún pariente directo (padres, abuelos, hermanos) padecen o han padecido algún tipo de cáncer?			
(Si) _____ (No)		¿Quién?	
28. Tipo de cáncer			
29. Tiempo de haber sido diagnosticado			
<b>Línea Materna</b>		<b>Línea Paterna</b>	
30. Nombre de la madre		43. Nombre del padre	
31. Edad:		32. ¿Vive? (Si) (No)	
33. ¿Hace algún tipo de ejercicio? (Si) (No)		44. Edad:	
34. Horas a la semana		45. ¿Vive? (Si) (No)	
35. Tipo de dieta		46. ¿Hace algún tipo de ejercicio? (Si) (No)	
Carbohidratos por día		47. Horas a la semana	
Grasas por día		48. Tipo de dieta	
Proteínas por día		Carbohidratos por día	
¿Cuántas comidas hace por día?		Grasas por día	
<b>Tabaquismo</b>		<b>Tabaquismo</b>	
36. Cigarros por día		49. Cigarros por día	
37. Años fumando		50. Años fumando	
38. Si no fuma actualmente ¿ha fumado alguna vez?		51. Si no fuma actualmente ¿ha fumado alguna vez?	
39. ¿Hace cuánto tiempo dejó de fumar?		52. ¿Hace cuánto tiempo dejó de fumar?	
<b>Enfermedades Cardiovasculares</b>		<b>Enfermedades Cardiovasculares</b>	
40. Enfermedad diagnosticada		53. Enfermedad diagnosticada	
41. ¿Hace cuánto tiempo fue diagnosticado?		54. ¿Hace cuánto tiempo fue diagnosticado?	
<b>Diabetes</b>		<b>Diabetes</b>	
42. ¿Hace cuánto tiempo fue diagnosticado?		55. ¿Hace cuánto tiempo fue diagnosticado?	
Notas relevantes o algún comentario de salud importante del participante o familiares directos			