



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Evaluación del porcentaje de metilación del ADN en sangre periférica ocasionado por el consumo del tabaco”

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de

Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

QFB Diana Monserrat Aguilar Beltrán

Dirigido por:

Dra. Karla Isabel Lira De León

Querétaro, Qro. a 25 octubre 2021



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Evaluación del porcentaje de metilación del ADN en sangre periférica ocasionado por el consumo del tabaco”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

QFB Diana Monserrat Aguilar Beltrán

Dirigido por:

Dra. Karla Isabel Lira De León

Dra. Karla Isabel Lira De León

Presidente

Firma

M. en IM. David Gustavo García Gutiérrez

Secretario

Firma

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote

Vocal

Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Suplente

Firma

M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa

Suplente

Firma

Centro universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación: _____

México

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá “La Chapis” por SIEMPRE creer en mí, más y mejor de lo que yo misma creo, por estar ahí, por “lanzarme” al mundo, por siempre brindarme el soporte en muchos y varios sentidos, por aceptar mi “yo” tan particular, por ser “mi Má, la Mujer, la Jovena” en mi vida.

A mi hermano mi Big Brother, por SIEMPRE estar, por orientarme, ayudarme, “adoptarme”, cuidarme, por quererme, consentirme, “obligarme” a seguir cuando no pensé que podía, por ser el mejor hermano que Dios pudo haberme dado; la vida sería complicada sin ti.

A mis “Totios”, Rosy Villagómez y Fernando Carranco, por darme una segunda casa que empezó con este proceso y sé que continua si lo necesitara nuevamente, por seguir cuidando de mí, ayudando, queriéndome sin tener obligación alguna de hacerlo; sin ustedes, esta etapa hubiera sido muy complicada y quizá difícil de culminar.

A los “Trocitos”, mis compañeros de generación, los primeros en esta aventura, Karlita Silva, Net Rivera, Jess Rodríguez, Jimmy Pérez; mi más profunda admiración para su carrera y mi cariño para cada uno de ustedes, la Maestría no la pude haber terminado sin ustedes a un lado, su comprensión, su soporte, los ojos que nunca me vieron distinto.

A mi primita, Marisa Cruz, por haber estado al inicio, en medio y al final de esta carrera, de diferentes formas y con diferentes ayudas, como prima, como amiga, como Doctora, en mi momento de caos, fuiste esa luz que me indico cómo y por dónde.

A mis profes, a los que vieron algo en mí, los que creyeron que podía, los que me dieron la oportunidad y los “argumentos” para seguir adelante, los que me mostraron el camino, de los que recibí algún consejo, a los que me alentaron.

Y sin duda, **a mi Moreneta y a Dios**, por la oportunidad, por siempre estar, sin duda, por ser especialmente afectos a mí.

GRACIAS

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS Y SIGLAS	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	7
2.1 El tabaco y sus daños	7
2.2 El papel de la nicotina	19
2.3 El cancer	23
2.4 Etapas del cancer	26
2.5 La metilación	29
2.5.1 SAM (S-adenosilmetionina)	31
2.5.2 Metilación de histonas	33
2.5.3 Metilación de ARN no codificante (ncARN)	36
2.5.4 Metilación de ARN	39
2.5.5 Metilación de ADN	39
2.5.6 Metiltransferasas (DNMT's)	45
2.6 Reparación del AND	47
2.7 Aberraciones en genes relacionados con fumadores	51
2.8 La metilación del ADN como biomarcador	55
3. HIPÓTESIS	57
4. OBJETIVOS	58
4.1 Objetivo general	58
4.2 Objetivos específicos	58
5. MATERIAL Y MÉTODO	59
5.1 Definición del universo/población	59
5.2 Tamaño de muestra	59

5.3 Descripción de las condiciones experimentales	59
Definición de las unidades de observación	59
Definición del grupo control	59
Criterios de inclusión	59
Criterios de exclusión	59
Criterios de eliminación	60
Definición de variables y unidades de medida	60
5.4 Selección de las fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información.	61
5.4.1 Metodología	61
5.4.2 Recursos materiales	61
5.4.3 Procedimiento	61
Obtención de muestras	61
Extracción, purificación y cuantificación de ADN	61
Integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa	63
Concentración y pureza de las muestras mediante espectrofotometría	65
Cuantificación de metilación	67
Definición de plan de procesamiento y presentación de la Información	69
6. RESULTADOS Y DISCUSION	71
6.1 Datos generales de consumo de tabaquismo en muestras del Proyecto	71
6.2 Edades de inicio de consumo del tabaco en hombres y Mujeres	72
6.3 Porcentaje de incidencia en los diferentes grupos de estudio	73
6.4 Distribución del tabaquismo en muestras del proyecto por edad y sexo	74
6.5 HSTM en el hogar	75
6.6 Incidencia de cáncer en familiares directos de participantes en el Proyecto	76
6.7 Análisis de varianza de la metilación de los diferentes grupos	77
7. CONCLUSIONES	86

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	87
9. ANEXOS	99
9.1 Recursos financieros de apoyo al proyecto (FOPER)	99
9.2 Aspectos éticos	100
9.3 Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI)	102
9.4 Formulario para participantes	103
9.5 Consentimiento informado	107

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales modificaciones de histonas	33
2	Valores de referencia para evaluar la pureza de ADN	66
3	Concentración y pureza de ADN extraído	67
4	Datos generales del tabaquismo en las muestras del proyecto	71
5	Valores de porcentaje de metilación y promedio por grupo	77
6	Análisis de varianza de un factor	79
7	Prueba post hoc de Bartlett	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efectos de la exposición al humo del cigarrillo en la modulación genética.	11
2	Señalización por AMPc	13
3	Visión general de los defectos inmunológicos causados por fumar en los pulmones	16
4	Efectos de la nicotina en el cerebro	21
5	Disposición cuantitativa de la nicotina en fumadores	22
6	Tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad mexicanas y mexicanos en México 2020	25
7	Proceso de las tres fases de la carcinogénesis	26
8	Ciclos del folato, la metiona y la transulfuración	31
9	La histona y sus modificaciones	34
10	Reordenamiento de la cromatina en el núcleo de las células con cáncer	34
11	Mecanismo de acción de miARN's	37
12	Metilación de citosina a 5-Metilcitosina.	40
13	Los estados de la cromatina regulados por la metilación del ADN	41
14	PMD en células con cáncer comparado con células normales	45
15	Proceso de metilación y desmetilación del ADN catalizado por las metiltransferasas.	46
16	Mecanismo potencial de desmetilación del ADN activo y pasivo.	50
17	Comparativa de firmas o signatures mutagénicas en cáncer de pulmón de fumadores y no fumadores	52
18	Porcentaje de las principales mutaciones en la firma o signature 4	53
19	Pasos generales para la extracción de ADN	63
20	Corrimiento electroforético de 44 muestras extraídas	65
21	Fórmula para el cálculo de porcentaje de metilación	68
22	Esquema del procedimiento del kit de metilación	69

23	Ejemplos gráficos de ANOVA	70
24	Inicio de consumo en ambos sexos vs media nacional	72
25	Distribución del tabaquismo en los diferentes grupos de estudio	73
26	Distribución del tabaquismo por edad y sexo	74
27	Porcentaje de personas expuestas al humo del cigarro en sus hogares	75
28	Incidencia tipo de cáncer de familiares directos	76
29	Símbolo universal de riesgo biológico	102

ABREVIATURAS Y SIGLAS

5''CAP	Nucleótido caperuza o casquete 5''
5-caC	5-carboxilcitosina
5-fC	5-formilcitosina
5-hmC	5-hidroximetilcitosina
5-mC	5 metil-citosina
6-mA	N6-metiladenina
A	Nucleótido adenine
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNm	ADN metilado
AID	Familia de proteínas de activación inducida por citidina desaminasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BER	Reparación de ADN por escisión de bases (Base Excision Repair)
BP	Benzo-a-pireno
C	Aminoácido citosina
cDMRs	Regiones diferencialmente metiladas en cáncer
cfADN	ADN libre de células (ADN circulante)
CGIs	Islas CpG
CIS	Carcinoma in situ
COMP	Proteína de matriz oligomérica de cartílago
CpA	Dinucleótido Citosina – enlace fosfato – Adenina
CpG	Dinucleótido Citosina – enlace fosfato – Guanina
CS	Humo del cigarro (cigarette smoke)
dATP	Nucleósido o desoxirribonucleótido trifosfato de desoxiadenosina
DC	Células dendríticas
dCTP	Nucleósido o desoxirribonucleótido trifosfato de desoxicitidina

DCGR8	Proteína nuclear de procesamiento de miARN
DICER	Proteína ARNasa del tipo III
DMR	Regiones diferencialmente metiladas
DNMT	Enzimas metiltransferasas
DROSHA	Proteína nuclear con dominio de unión a ARN (ARNasa tipo III)
DSBs	Rupturas de ADN de doble cadena
dTTP	Nucleósido o desoxirribonucleótido trifosfato de desoxitimidina
E-cig	Cigarrillo electrónico
EDTA	Tampón ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ENADID	Encuesta Nacional de Dinámica Poblacional
ENCODAT	Encuesta Nacional de Consumo de Drogas
ENT	Enfermedades no transmisibles
EpiSmokEr	Estimador epigenético del estado de tabaquismo (Epigenetic Smoking status Estimator)
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EWAS	Estudio de asociación amplia del epigenoma (Epigenome wide association study)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FOPER	Fondo de proyectos especiales de rectoría de la Universidad Autónoma de Querétaro
G	Aminoácido guanina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GO	Fase de la célula en el cual esta permanece en un estado vegetativo
GTP	Guanosín Trifosfato
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo (Genome Wide Association Study)
HDMTs	Enzimas demetilasas
HMTs	Enzimas metiltransferasas
HTSM	Humo de Tabaco de Segunda Mano

H3, H4 H2A, H2B	Histonas
ICGC	Consortio Internacional del Genoma del Cáncer (International Cancer Genome Consortium)
IgE	Inmunoglobulina E
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleucina
IMAO	Inhibidor de la Mono-amino-oxidasa
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
K-me	Residuo de lisina metilada (1 mono, 2 di, 3 tri metil lisina)
LAD	Dominios asociados a lamina
lncARN	ARN largo no codificante
LINE	Elementos transponibles intercalados largos
LOCK	Regiones largas de cromatina marcadas por metilación de histonas
MAO	Enzima mono-amino-oxidasa
MBD	Proteínas del dominio de unión a metil-CpG (Methyl-CpG-binding domain proteins)
MCS	Corriente principal del humo del cigarrillo (mainstream)
MeDIP-seq	Análisis de secuenciación de inmunoprecipitación de ADN metilado
MMP12	Metaloproteinasa 12
MAT	Metionina adenosil transferase
miARN	Micro ARN
MTHFR	Metil-tetrahidrofolato-reductasa
MUC5B	Gen de la mucina 5B
nAch	Receptor nicotínico ionotrópico de Acetilcolina
ncARN	ARN no codificante
NER	Reparación de ADN por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair)
NK	Células Natural Killer
NuRD	Complejo multiproteico con actividad histona deacetilasa y remodelador del nucleosoma

OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAHs	Hidrocarburo aromático policíclico
pb	Pares de bases
PG	Propilenglicol
PMD	Dominio parcialmente metilados
PIREBSA	Planta Incineradora de Residuos Bio Infecciosos
POL II	Polimerasa II
pre-miRNA	Precursor de miARN
pri-miRNA	Transcrito primario de miARN
Proteína G	Familia proteica cuya función principal es llevar una señal desde un receptor en la membrana celular hasta una o varias proteínas diana
PRMt1	Proteína arginina metiltransferasas
RAN	GTPasa Ran, proteína G monomérica con actividad hidrolítica de GTP
rARN	ARN ribosomal
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
R-me	Residuo de arginina metilada (1 mono, 2 di metil arginina)
RPBI	Residuos peligrosos biológico-infecciosos
SAM	S-adenosilmetionina
SAH	S-adenosil-homocisteína
SCS	Corriente secundaria del humo del cigarrillo (sidestream)
SDS	Tampón dodecilsulfato sódico
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SET	Dominio de proteína que normalmente tiene actividad metiltransferasa
SINE	Elementos transponibles intercalados cortos
SMUG1	Gen uracil-ADN glucosilasa monofuncional 1 selectiva
SSBs	Rupturas de ADN una sola cadena
T	Aminoácido timina
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA

tARN	ARN de transferencia
TCGA	Atlas del genoma del cáncer (The Cancer Genome Atlas)
TDG	Timina-ADN Glicosilasa
TET	Familia de enzimas Translocación diez-once (Ten-Eleven-Translocation)
THF	Tetra-hidrofolato
TH2	Linfocitos cooperadores 2 (T helper 2)
TP53	Gen de la proteína supresora de tumores, "guardián del genoma"
TRIS	Buffer trisaminometano
TSNA	Nitrosaminas específicas del tabaco
UDG	Uracil-ADN glucosilasa monofuncional selectiva
VG	Glicerina vegetal
VLP	Reparación de ADN de parches muy largos (Mitsmach Repair)
VSP	Reparación de ADN de parches muy cortos (Base Excision Repair)
ZNF	Proteínas de dedos de zinc

RESUMEN

El tabaquismo en Querétaro se ha reducido desde el 2018, poniendo al Estado por debajo de la media nacional de 20.1%, la cual, se ha mantenido casi en el mismo porcentaje en los últimos años; sin embargo, a nivel mundial no ha pasado lo mismo, dado que se ha incrementado un 2.8% en particular en personas jóvenes. En México el 30% de los consumidores comienzan su adicción alrededor de los 12 años y esto aumenta el riesgo de inducir cambios epigenéticos aberrantes que pueden ser heredados; como la metilación del ADN, un proceso que involucra la transferencia covalente de un grupo metilo a una citosina pareada con una guanina; la mayor cantidad de estos dinucleótidos se encuentran en sitios llamados islas CpG's en las regiones promotoras de los genes, y al modificarse afectan de manera directa los procesos transcripcionales. Cuando este mecanismo se presenta de manera aberrante como en la hipometilación, se pueden activar oncogenes, y en el caso contrario; se ha descrito la hipermetilación en los promotores de genes supresores de tumores o los encargados de la reparación del ADN causando el silenciamiento de estos. La finalidad de este proyecto fue establecer el porcentaje de metilación del ADN global en linfocitos de sangre periférica y su correlación con el consumo del tabaco, para establecer su asociación y proponerlo como un posible marcador temprano en cáncer de pulmón. Se establecieron dos poblaciones de estudio: estudiantes de entre 18 y 24 años de edad y personas diagnosticadas con cáncer de pulmón. Con los datos del cuestionario llenado por los estudiantes, se clasificaron como fumadores, no fumadores, exfumadores y fumadores pasivos dependiendo del número de cigarrillos u horas de exposición. Mediante un diseño transversal comparativo, los resultados fueron procesados con la medida estadística de ANOVA y la prueba post hoc de Bartlett, observándose una diferencia significativa entre las medias de los diferentes grupos establecidos, con un valor de p menor a 0.05, concluyendo que los grupos de fumadores y cáncer de pulmón que mostraban mayor porcentaje de metilación en ADN genómico, sugiriendo que esto pudiera estar asociado con el consumo de tabaco.

Palabras clave: Epigenética, metilación del ADN, tabaquismo, marcador, cáncer.

ABSTRACT

Smoking in Querétaro has been decreased since 2018, below the national average statewide, despite it has remained almost at the same percentage; worldwide it has increased 2.8% particularly in young people. In Mexico, 30% of consumers start their addiction around the age 12 and this confers a risk due to the epigenetic changes that can appear and be inherited, such as DNA methylation; a process that involves the covalent transfer of a methyl group to a cytosine paired with a guanine; most of these dinucleotides are found in sites called CpGs islands in the gene promoters; which when modified directly affect transcriptional processes. When this mechanism occurs aberrantly as in hypomethylation; oncogenes can be activated, in the other hand, hypermethylation has been described in the promoters of tumor suppressor genes or those responsible for DNA repair, causing them to be silenced. The purpose of the project was to establish the percentage of global DNA methylation in peripheral blood lymphocytes and its correlation with tobacco consumption, to establish the strength of their association and propose it as a possible early marker in lung cancer. Two study populations were established: students between 18 and 24 years of age and people diagnosed with lung cancer. With the data from the questionnaire filled out by the students, they were classified as smokers, non-smokers, ex-smokers and passive smokers depending on the number of cigarettes or hours of exposure. Through a comparative cross-sectional design, the results were processed with the statistical measure of ANOVA and the Bartlett test post hoc, observing a significant difference between the medians of different established groups, with a p value less than 0.05, concluding that the groups of smokers and lung cancer groups showed the highest percentage of methylation in genomic DNA, suggesting that this could be associated with tobacco consumption.

Keywords: Epigenetics, DNA methylation, smoking, marker, cancer.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink that reads "Diana Beltrán". The signature is written in a cursive style with a blue ink color.

Diana Monserrat Aguilar Beltrán

1. INTRODUCCION

El tabaco es el único producto legal cuya exposición al humo que desprende durante su consumo incrementa la mortalidad en más de la mitad de sus usuarios, esto mantiene al tabaquismo como la primera causa de muerte prevenible a nivel mundial. En abril del 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó que esta adicción causa la muerte de una persona cada seis segundos, además de aumentar el riesgo para seis de las ocho causas de muerte más prevalentes y para las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) en el mundo: las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades pulmonares crónicas y la diabetes. Si las tendencias actuales continúan, la OMS considera que, a partir de 2030, el tabaquismo causará la muerte en más de ocho millones de personas en todo el mundo (Organización Panamericana de la Salud, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2017; Organización Mundial de la Salud, 2020).

El tabaquismo es una intoxicación que se produce por la dependencia a la nicotina y se ha observado que, esta adicción se puede generar más rápidamente en los niños y jóvenes que en los adultos puesto que el cerebro se encuentra en desarrollo hasta los 21 años de edad. En menos de dos décadas, la cantidad de fumadores en México se incrementó de 9 a 14.9 millones de fumadores último dato oficial publicado por la Comisión Nacional de Adicciones en marzo del 2020, siendo 11.1 millones hombres y 3.8 millones mujeres y de todos ellos 5.5 millones fuman a diario. En Querétaro se ha visto una disminución de aproximadamente un 2% en adultos, esto ha llevado al estado a pasar del cuarto al octavo lugar a nivel nacional, de acuerdo con el porcentaje de adicción; quedando por primera vez en mucho tiempo por debajo de la media nacional de prevalencia de consumo según la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas (ENCODAT) en el 2017 (Comisión Nacional contra las Adicciones, 2020; Reynales, et al., 2017).

El consumo de tabaco incrementa entre 15 y 30 veces más el riesgo de contraer cáncer de pulmón o morir prematuramente en comparación con las personas que no fuman; dejar de fumar, disminuye el riesgo de cáncer y la presencia de las otras

enfermedades relacionadas con el tabaquismo, esto se debe a que el humo del tabaco es una mezcla de más de siete mil sustancias químicas y al menos 70 de éstas son cancerígenas en personas y animales con mayor tropismo en órganos como: pulmones, nariz, boca, garganta, cuerdas vocales, esófago, vejiga, riñones, páncreas, cuello uterino, estómago, sangre y médula ósea (Secretaría de Salud, 2015).

Afecciones que incluyen cáncer, trastornos metabólicos y trastornos degenerativos, pueden ser ocasionadas por modificaciones epigenéticas, las cuales son alteraciones en las histonas que empaquetan el ácido desoxirribonucleico ADN o en la misma molécula de ADN, en donde no hay cambios en su secuencia, pero pueden afectar la regulación y/o expresión del gen. El epigenoma se compone de todos los compuestos químicos que se agregan o marcan a todo el ADN (genoma) para regular la expresión de todos los genes. Los factores ambientales, como la dieta, el ejercicio, el estrés, los fármacos y la exposición a contaminantes también pueden afectar el epigenoma; el humo del tabaco ha sido completamente implicado en este proceso. El tabaquismo tiene un amplio impacto en la metilación del genoma, que en varios locus persiste muchos años después de dejar de fumar. Se han identificado nuevos genes metilados por efecto de esta adicción y podrían representar posibles marcadores tempranos de exposición o para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el mismo (Joehanes, et al., 2016; National Library of Medicine, 2020).

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que utilizan las células para controlar la expresión génica; esta es una herramienta en general para los eucariontes, para la protección de la integridad del genoma poniendo genes en la posición de "apagado" o "encendido". Se ha vinculado la metilación anormal del ADN a varias enfermedades humanas, tales como lupus, el cáncer, la distrofia muscular y diversos defectos congénitos. Hasta ahora, gran parte de las investigaciones se han centrado en el cáncer y en los genes supresores de tumores, encontrando que la hipermetilación da lugar a menudo al silenciamiento de los genes supresores de tumores en células cancerígenas (Maeda, et al., 2018).

En este proyecto la epigenética y su relación con el tabaquismo son definidas, al igual que los daños ocasionados en el organismo y su posible reparación; con base en esto, la investigación puede ser parte de las bases para el pronóstico y tratamiento temprano del cáncer de pulmón; el tabaquismo y el humo de segunda mano, son los factores de riesgo más importantes para este tipo de cáncer; y al no provocar ningún signo o síntoma inicial, es imperativa la necesidad de estudios que nos ayuden en el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Por tanto, el objetivo de este estudio se centró en evaluar el tabaquismo como uno de los principales factores de riesgo en la regulación epigenética, de manera particular la metilación aberrante del ADN; que en el futuro podría ser evaluado como marcador para el pronóstico temprano del cáncer de pulmón, ayudando a un mejor diagnóstico y tratamiento de una de las enfermedades con menor porcentaje de supervivencia a 5 años (18.1% en Estadio I) (National Cancer Institute, 2017).

2. ANTECEDENTES

2.1 El tabaco y sus daños

El tabaquismo es una de las mayores amenazas para la salud pública que ha tenido que afrontar el mundo, causa la muerte de casi seis millones de personas al año, de las cuales más de cinco millones son consumidores directos y más de 600,000 son no fumadores expuestos al humo ajeno. El consumo de tabaco ha disminuido debido a las campañas de promoción de salud y las acciones legislativas, teniendo como consecuencia una reducción en el número de fumadores activos. A pesar de la disminución, la prevalencia del tabaquismo en muchos países sigue siendo la principal causa prevenible de muerte en el mundo (Joehanes, et al., 2016; Leon, et al., 2015).

El tabaco es una planta originaria de América, cuyo uso ha perdido la finalidad curativa y ceremonial para lo que antiguamente era utilizada. El principal componente activo es la nicotina, sustancia responsable de la adicción al tabaco (Organización Mundial de la Salud, 2017b). Se encuentra en los cigarrillos, cigarros puro, tabaco de pipa, cigarros electrónicos y tabaco de mascar. La forma más usual para el consumo del tabaco es fumarlo en cigarrillos; los cuales se hacen de hojas secas del tabaco y otras sustancias se agregan para dar sabor y hacer más agradable fumar. El humo de estos productos está formado de una mezcla compleja de químicos generados por la combustión del tabaco, incluyendo material radioactivo y de sus aditivos (Leon, et al., 2015).

Los cigarrillos electrónicos (e-cigs) son dispositivos alimentados por baterías con elementos calefactores; crean un vapor que contiene nicotina, así como sustancias potencialmente dañinas como compuestos orgánicos volátiles, partículas, metales pesados como níquel, estaño, plomo, saborizantes como el diacetilo, sustancia química vinculada a enfermedad grave de los pulmones. Ha habido un fuerte aumento en el uso de cigarrillos electrónicos y productos relacionados desde su introducción en el mercado en 2007 (Freudenheim, et al., 2019).

Los cigarrillos electrónicos que suministran nicotina al calentar líquidos contienen sabores, propilenglicol (PG) y glicerina vegetal (VG). Aunque PG y VG son "generalmente considerados seguros" por la FDA cuando se usan en alimentos y productos cosméticos, se desconoce su seguridad cuando se inhalan como aerosoles electrónicos calentados. Las preocupaciones giran en torno a los componentes de los aerosoles electrónicos (por ejemplo, compuestos orgánicos volátiles) y los efectos sobre la inflamación, la función inmune innata, el estrés oxidativo, la citotoxicidad y la genotoxicidad. En los seres humanos, los biomarcadores carcinógenos urinarios y sanguíneos son sustancialmente más bajos entre los usuarios de cigarrillos electrónicos en comparación con los fumadores, mientras que los estudios de esputo y aire exhalado muestran una mayor inflamación con el uso de cigarrillos electrónico (Song, et al., 2020).

Se ha demostrado que los cambios en la proteómica pulmonar, las proteasas y la expresión génica están asociados con el uso de cigarrillos electrónicos en sujetos sometidos a broncoscopia. Puede haber algunos efectos específicos de los cigarrillos electrónicos; se han encontrado expresión de algunos genes y metilación del ADN de algunos loci donde los valores para los usuarios de e-cig eran más altos en los que nunca habían fumado cigarrillos y en los fumadores convencionales (por ejemplo, MUC5B y otras proteínas pulmonares importantes). Se considera que la inflamación juega un papel importante en la carcinogénesis y la enfermedad pulmonares obstructiva crónica (EPOC); se sabe que los biomarcadores inflamatorios son más altos entre los fumadores que entre los que nunca han fumado. En un estudio hecho por Song y cols. en 2020, los usuarios de cigarrillos electrónicos tenían infiltrados inflamatorios más altos que los que nunca habían fumado y más bajos que los fumadores. En comparación con los que nunca fumaron, hubo diferencias significativas para los usuarios de cigarrillos electrónicos para IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , asociados con el cáncer de pulmón; también para IL-2, IL-6, IL-6 e IFN- γ , asociados con la EPOC (Caliri, et al., 2020; Song, et al., 2020).

El Instituto Nacional de Salud Pública analizó a la población consumidora de este producto y detectó que al menos 5,000,000 de mexicanos, de entre 12 y 65 años,

han tenido contacto con este tipo de productos que genera serios problemas a la salud. Fue a través del estudio de factores asociados a la frecuencia de uso de los cigarrillos electrónicos, que el organismo gubernamental precisó que los consumidores del vapeo en México representan el 5.9% de la población (Reynales, et al., 2017).

Por consumo del tabaco, Querétaro se posiciona en octavo lugar, con las siguientes estadísticas:

- inician el consumo diario de tabaco a los 20.4 años, los hombres a los 20 años y las mujeres a los 21.7 años;
- a partir del 2018, se ve un decremento en el Estado, pasó de un 27.5% a un 19.1% de prevalencia en la población vs 20.1% de la población nacional;
- entre los 12 a 65 años correspondiente a 18,000 adolescentes y 264,000 adultos;
- se registra la muerte de dos personas al día por enfermedades relacionadas con el consumo de tabaco;
- es la sexta entidad con la prevalencia más alta de exposición al Humo de Tabaco de Segunda Mano (HTSM) en el hogar y en el trabajo (Promedio nacional 14.1% y 15.2%, Querétaro 16.9% y 16.5% respectivamente)
- Hasta marzo del 2020, en adultos entre los 18 y 65 años, el porcentaje total de fumadores actuales en hombres era de 33.7% y 10.6% en mujeres; situación que debe tener un seguimiento especial con estas últimas, en las que el tabaco provoca un daño más severo que en los hombres (Comisión Nacional contra las Adicciones, 2020; Reynales, et. al., 2017).

El riesgo de sufrir cáncer de mamá o afecciones en las vías respiratorias es mayor en las mujeres que en los hombres debido a las características propias del organismo y del sistema hormonal femenino. En comparación con sus pares no fumadoras, las mujeres fumadoras tienen un riesgo significativamente mayor de neoplasia colorrectal avanzada después de tan solo 10 años de fumar, mientras que para los hombres se necesitan 30 o más años para que el riesgo alcance

significación estadística (Allen, et al., 2016). Las mujeres tienen un riesgo adicional de cánceres específicos de género. En una muestra de casi 80,000 mujeres posmenopáusicas, de un estudio llevado a cabo en 2013 por Luo, et al., se observó un aumento de 9% y 16% en el riesgo de cáncer de seno entre las exfumadoras y las fumadoras actuales, respectivamente, en comparación con las que nunca fumaron. Aunque fumar aumenta el riesgo de enfermedad coronaria para ambos sexos, varios estudios han observado diferencias de género en la asociación entre fumar y la salud cardiovascular: las mujeres que fuman tienen un riesgo 25% mayor de enfermedad coronaria que sus homólogos fumadores masculinos, relacionando a las hormonas sexuales con esta función. Cupisti, et al. en el 2010 observaron que fumar se asoció con mayores niveles de insulina en ayunas, testosterona libre e índice de andrógenos libres para una muestra de 346 mujeres con síndrome de ovario poliquístico; estos niveles aumentados dieron como resultado una resistencia a la insulina agravada y, potencialmente, un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Un segundo factor contribuyente puede ser el efecto del tabaquismo sobre la hipertensión arterial y la disfunción endotelial: en comparación con sus pares no fumadores, las fumadoras hipertensas tenían niveles más bajos de glucosa en ayunas, presión arterial diastólica y sistólica más alta, frecuencia cardíaca más alta. Aunque dejar de fumar puede reducir significativamente este riesgo, el aumento de peso después de dejar de fumar limita los beneficios de dejar de hacerlo. Los fumadores que ganaron poco peso durante el abandono del hábito de fumar no tuvieron una reducción significativa en el riesgo de enfermedad coronaria en comparación con los fumadores actuales. Por lo tanto, el ejercicio durante el abandono del hábito de fumar puede ser especialmente útil para la salud cardiovascular porque no solo reduciría el aumento de peso después del abandono, sino que también se ha demostrado que disminuye la intensidad del proceso de inflamación, reflejándose en una disminución en la medición de glóbulos blancos, factor trombotico; no se eliminan los depósitos grasos que ya existen pero sí bajará los niveles de colesterol LDL, las grasas como los triglicéridos que circulan en la sangre, lo que ayudará a que la acumulación de nuevos depósitos grasos en las

arterias sea más lenta al mismo tiempo y aumentará los niveles de colesterol HDL a valores normales (Allen, et al., 2016; Cupisti, et al., 2010; Luo, et al., 2011).

Debido al proceso de añejamiento utilizado para hacer los cigarrillos puros, el tabaco tiene altas concentraciones de ciertos compuestos de nitrógeno (nitratos y nitritos); cuando se fuma estos compuestos generan varias nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA, por sus siglas en inglés). Además, debido a que la envoltura del cigarrillo puro es menos porosa que la del cigarrillo, el tabaco no se quema completamente. El resultado son concentraciones más elevadas de óxidos de nitrógeno, amoníaco, monóxido de carbono y alquitrán, las cuales conforman todas sustancias muy nocivas (Leon, et al., 2015).

Aunque los efectos adversos para la salud del tabaquismo son bien conocidos, se sabe menos acerca de sus mecanismos subyacentes de toxicidad, especialmente a nivel molecular (Zhu, et al., 2016). Lo que se sabe hasta ahora de los mecanismos de como el humo del tabaco afecta al ADN se muestran en la figura 1.

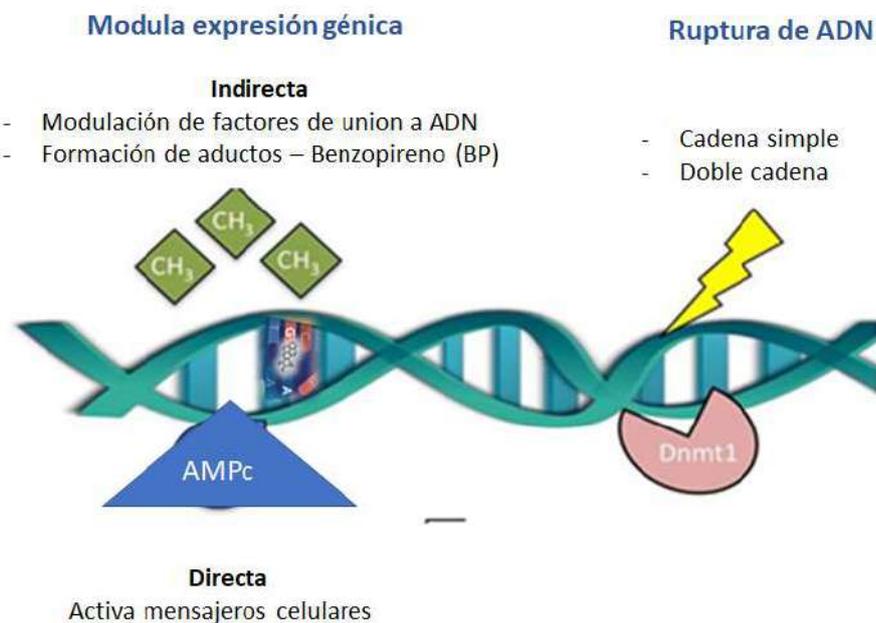


Figura 1. Efectos de la exposición al humo del cigarrillo en la modulación genética. Modificado de autor (Lee y Pausova, 2013; Tontonoz, 2018).

El humo del cigarro puede modular la expresión génica de dos maneras:

A) De manera indirecta

a) Modulación de factores de unión a ADN.

- Puede influir en la unión de proteínas al ADN, las cuales inician y realizan la transcripción, de manera directa mediante un impedimento físico o indirectamente a través de la remodelación de la cromatina y su efecto sobre la accesibilidad del ADN para las proteínas que regulan la transcripción. Con esto se modifica no solo la cantidad si no también la forma de ácido ribonucleico (ARN) producido (Lee y Pausova, 2013).
- Por hipoxia, regulando a la baja la metionina adenosil transferasa 2A (MTA 2A) enzima que sintetiza S-adenosilmetionina, un importante donante de metilo biológico crítico para los procesos de metilación del ADN, provocando la relajación de la cromatina, dejando al descubierto el espacio para la maquinaria transcripcional (Lee y Pausova, 2013).

b) Formación de aductos.

El benzo-a-pireno (BP), así como las nitrosaminas (TSNA) son los químicos del tabaco más estudiados; el BP por ejemplo es un hidrocarburo aromático policíclico (PAHs), el cual cuenta con una forma soluble en agua, llamada epóxido que se une al ADN formando adjuntos voluminosos o aductos, que deforman al ADN, y se ha demostrado que se forman preferentemente en las bases de la guanina (G). Cuando un ADN con aducto se replica las enzimas que copian tienden a colocar una base de adenina opuesta a esta guanina, en lugar de la citosina (C) habitual. Esto lleva a lo que se llama una conversión de G a T (Timina). Una gran cantidad de conversiones de G a T en el ADN es un sello distintivo del daño inducido por fumar y se ha denominado la "firma de fumar". Entre los genes comúnmente mutados en el cáncer de pulmón se encuentra TP53, que produce un supresor tumoral. Los científicos han demostrado que los sitios de mutación en el gen TP53 que se encuentran

principalmente en personas con cáncer de pulmón coinciden con los sitios de formación de aductos (Konstantinou, et al., 2018; Tontonoz, 2018).

B) De manera directa

a) Activa mensajeros celulares

El tabaquismo puede regular la expresión génica de manera directa activando mensajeros celulares cuando la nicotina se une y activa los receptores acetilcolina incrementando el calcio intracelular, conduce a la activación río abajo de la proteína de unión del mensajero Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), un segundo mensajero involucrado en la transcripción de genes como se muestra en la figura 2 que median la progresión del ciclo celular (las células en estadio G0 tienen un mayor contenido de AMPc), diversas respuestas celulares como la inhibición de la proliferación celular y las respuestas innata y adaptativa (Fajardo, et al., 2014; Lee y Pausova, 2013).

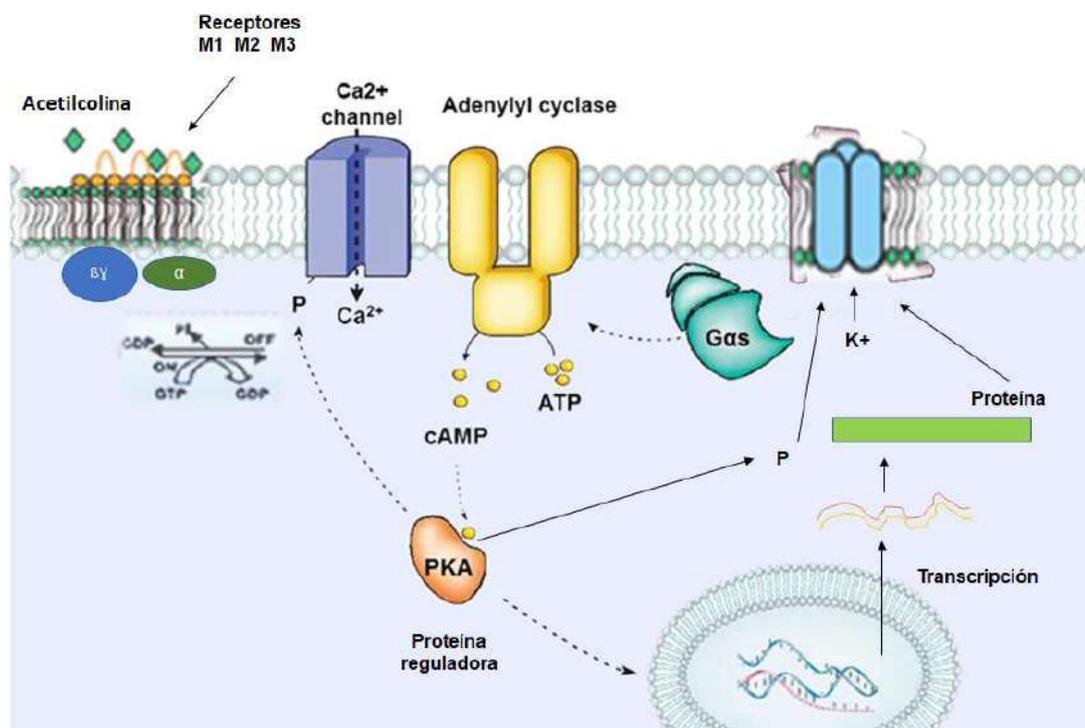


Figura 2. Señalización por AMPc. Modificado de autor (Oliveira y Bravo, 2020).

El humo del tabaco también puede generar rupturas en el ADN

A) Rupturas de una sola cadena (SSBs)

Los componentes o carcinógenos pueden inducir la ruptura en el ADN de una sola cadena; en general estas rupturas resultan del ataque a los residuos del azúcar 2-desoxirribosa del ADN, que alberga un fosfato o fosfoglicolato, modificando la química de las bases, y estas modificaciones pueden destruir la estructura helicoidal de las moléculas. SSBs representan el daño inicial del ADN, estas se pueden convertir en una ruptura de doble cadena (DSBs) y se utilizan a menudo como un biomarcador de la exposición (Sanner y Grimsrud, 2015).

B) Rupturas de ambas cadenas (DSBs)

Se consideran biológicamente más relevantes ya que pueden conducir a la translocación cromosómica, inestabilidad genética y la muerte celular en el caso de repararse de forma inadecuada, o si no se repara; esta lesión se considera como la más importante observada en el inicio del cáncer (Sanner y Grimsrud, 2015).

El humo del cigarrillo convencional (por sus siglas en inglés MCS) consiste en una compleja mezcla física de gases y partículas que se forman a través de la combustión incompleta de tabaco. MCS comprende más de 7000 componentes químicos, alrededor de 250 son nocivos y aproximadamente 50 causan cáncer (carcinógenos); la concentración de humo de un cigarrillo fresco es de 108–1010 partículas por cm^3 y los cambios en el tamaño de partícula depende del tiempo de residencia de las partículas de humo o coagulación; es decir, las partículas de humo se coagularán en la boca tanto durante la inhalación como durante cualquier retención en la boca antes de la inhalación, lo que provocará cambios en el tamaño de las partículas de humo, los resultados pueden tener implicaciones para la dosis de tóxicos de humo en el pulmón. Estos se pueden obtener en los dos tipos de corrientes que se producen al consumir un cigarro, una principal o fase de partícula que es inhalada por el fumador y que contiene un 25% del total, y una corriente lateral o condensado con el 75% restante procedente de la combustión pasiva del

tabaco que pasa al aire ambiente, encontrándose productos carcinógenos en ambas corrientes de humo (John, et al., 2020; Pérez, 1995). La fase de partícula de la corriente principal contiene los principales compuestos carcinógenos, como la nicotina y el alquitrán. Los compuestos nocivos como el monóxido de carbono que se encuentran en la corriente lateral o fase gaseosa son los responsables de la aparición de neoplasias en fumadores pasivos (Cui, et al., 2019; John, et al., 2020). Se ha informado que los cigarrillos electrónicos contienen también sustancias tóxicas en niveles de traza 9–450 veces más bajos que en los cigarrillos tradicionales, y sin sinergias toxicológicas entre sus compuestos. Sin embargo, numerosos estudios sugieren lo contrario, concluyendo que los cigarrillos electrónicos son peligrosos y deben regularse de manera similar a los cigarrillos tradicionales. Se ha descubierto que el calentamiento de líquidos electrónicos a altas temperaturas libera compuestos carbonílicos cancerígenos, como el formaldehído, el acetaldehído y la acroleína; además de que los pulmones son especialmente vulnerables a la exposición al cigarrillo electrónico, ya que las partículas de vapor electrónico se depositan en los pulmones en un patrón similar al de las partículas de humo de cigarrillo, produciendo cambios en la expresión del gen bronquial y un aumento de la oxidación, estrés e inflamación (Yu, et al., 2016). Un aspecto crítico de la defensa del organismo contra las infecciones bacterianas son las células altamente fagocíticas llamadas macrófagos. La capacidad de estas células para eliminar los patógenos a través de la fagocitosis es necesaria para controlar las infecciones pulmonares debilitantes. Por lo tanto, la fagocitosis es un proceso celular necesario que reconoce los patógenos / partículas extrañas y los elimina; las infecciones crónicas de la vía aérea inferior podrían implicar la disfunción de la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares; un posible mecanismo para la disminución de la fagocitosis en los macrófagos alveolares es el deterioro de la autofagia inducida por el humo del cigarrillo (CS) (Pehote, et al., 2017). La fase partícula directamente activa células fagocíticas del pulmón (principalmente macrófagos y células epiteliales), lo que explica algunos de sus efectos proinflamatorios y procoagulantes. La unión de ambas fases (de partícula y

condensado del cigarrillo) daña lípidos, proteínas, la matriz intracelular, ADN, expresión génica y organelos, de este modo tienen un efecto proinflamatorio. En promedio, los fumadores muestran un recuento de glóbulos blancos periféricos elevado, aproximadamente un 30% más alto que el de los no fumadores (Tsai, et al., 2018). De manera general se puede ver la figura 3 que muestra algunas alteraciones en las diferentes barreras inmunológicas:

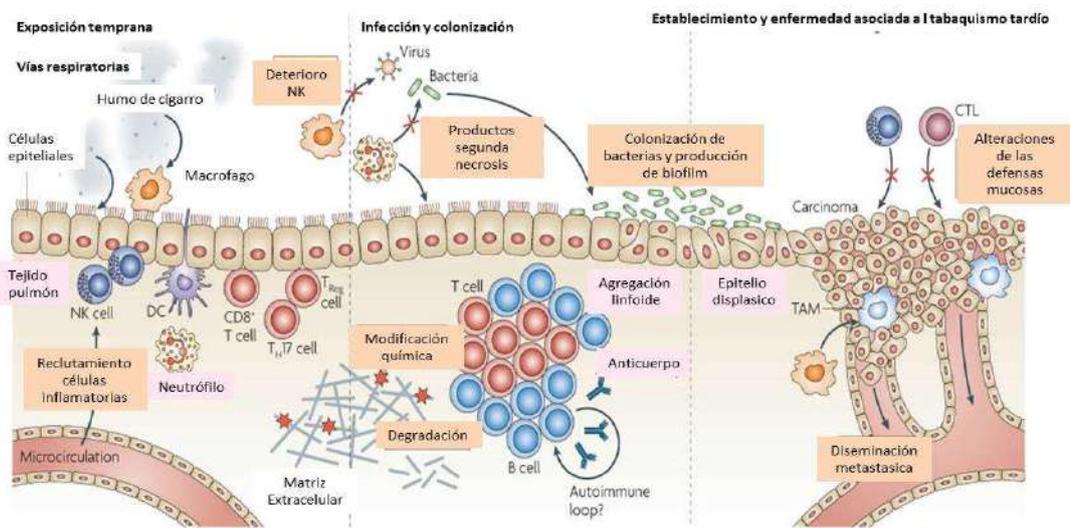


Figura 3. Visión general de los defectos inmunológicos causados por fumar en los pulmones. Modificado de autor (Stampfli y Anderson, 2009).

- **Epitelio respiratorio:** Primera línea de defensa, el tabaquismo compromete directamente esta barrera, incrementando la permeabilidad e impide el aclaramiento mucociliar. También, activa las células epiteliales para producir mediadores proinflamatorios e induce el daño directo oxidativo a la membrana de lípidos y produce rupturas amplias de ADN de una sola cadena, desencadenando reparaciones y cascadas apoptóticas; esto produce un daño crónico que inflama y transforma el tejido, provocando hiperplasia, metaplasia, displasia y neoplasias benignas y malignas (García, et al., 2015; Pehote, et al., 2017).

- **Macrófago alveolar:** Su función es eliminar agentes microbianos en el principio de la infección, el tabaquismo incrementa el número de macrófagos alveolares y los activa para producir mediadores proinflamatorios, especies de oxígeno reactivas y enzimas proteolíticas; así proveen mecanismos celulares que vinculan el tabaquismo con la inflamación y el daño del tejido. Pero también, compromete la habilidad de los macrófagos alveolares para fagocitar bacterias y células apoptóticas. Convencionalmente los macrófagos del tipo M1 (los cuales expresan óxido nítrico sintasa) se piensa que son activados por el tipo de células T1 citotóxico (Tc1) asociadas al interferón IFN- γ , son efectores proinflamatorios y tienen factores bactericidas; mientras que los macrófagos activados alternativamente M2 asociados a interleucinas-4 (IL-4) o IL-13 están involucrados en la resolución de la inflamación y la curación del tejido. Se piensa que el tabaquismo induce parcialmente la desactivación de los macrófagos tipo M1 o la activación del tipo M2; la intensidad de este efecto tiene implicaciones directas sobre el sistema inmune afectando las defensas del huésped haciendo que M1 pueda causar marcas de daño permanente en el pulmón, mientras M2 es asociado a la progresión del tumor (Madani, et al., 2018).
- **Células NK:** Hay evidencias que sugieren que las células Natural Killer (NK), tienen un importante rol en la defensa innata del huésped contra agentes microbianos y en la vigilancia inmune antitumoral protectora. Esto lo logran por una citotoxicidad directa por medio de las perforinas y granzimas. Varios estudios muestran que las NK disminuyen su actividad en fumadores, esto vincula al incremento de infecciones y cáncer; los fumadores tienen menos del 47% de la actividad NK de los no fumadores, pero esta condición se ha demostrado que puede ser reversible dejando de fumar por 6 semanas (Arcavi y Benowitz, 2004; Stampfli y Anderson, 2009).
- **Células dendríticas (DCs):** En los pulmones, las DCs, son las más potentes células presentadoras de antígenos y son indispensables para la iniciación de la respuesta inmune mediado por células T, son probablemente las más

susceptibles al humo del cigarro por su posición anatómica, en el lumen y directamente debajo del epitelio del pulmón. Estudios clínicos sugieren que el número de células DCs maduras es reducido en las vías respiratorias en pacientes que fuman, además de disminuir la expresión de moléculas coestimuladoras como la IL-23 y T helper 1 (Stampfli y Anderson, 2009).

- Células B y autoinmunidad mediada por anticuerpos: Se ha propuesto la autoinmunidad como causa de la enfermedad pulmonar inducida por el humo; se ha visto que por efecto del tabaquismo disminuye en suero los niveles de todas las clases de inmunoglobulinas, excepto IgE, hasta un 10 a un 20% menos que en los no fumadores; también posiblemente sirva como inductor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en los pulmones, lo que aumenta la capacidad de las DC de presentar al antígeno y posiblemente inducir las respuestas inmunes predispuestas por el tipo TH2; se secreta una cantidad abundante de células B en los pulmones de los fumadores a largo plazo y pueden contribuir al aumento de la sensibilización alérgica causada por el humo (Arcavi y Benowitz, 2004; Stampfli y Anderson, 2009).
- Células T: La retención de las células T CD8 en los pulmones de los fumadores crónicos merece una atención especial ya que el humo del cigarro puede afectar su capacidad defensiva, estas células pueden activar los macrófagos alveolares al producir la metaloproteinasa 12 (MMP12), es una metaloelastasa, expresada principalmente en macrófagos, e influye en su capacidad migratoria (Madani, et al., 2018).

Paralelamente, los contaminantes del humo cruzan directamente a través de la interfaz alveolo-capilar y se propagan a través del torrente sanguíneo sistémico dirigido a diferentes órganos. En consecuencia, CS induce una inflamación sistémica de bajo grado y un mayor estrés oxidativo en el sistema vascular.

En la sangre, estos procesos promueven un aumento de la coagulación y la disfunción endotelial.

- En el tejido muscular, los procesos inflamatorios activan vías de señalización catabólicas seguidas de desgaste muscular y sarcopenia.
- En el cerebro, se describieron varias características de la neuro inflamación.
- Liberación de mioquinas de la contracción del músculo esquelético, elevaciones de cortisol y adrenalina, la expresión reducida de receptores tipo Toll y mayor movilización de los subtipos de leucocitos inmunorreguladores (Zhu, et al., 2016).

También el fumar, está asociado con la metilación de genes relacionados con enfermedades cardiovasculares y podría contribuir a la progresión de la enfermedad a través de reacciones inmunes, respuestas inflamatorias, apoptosis inducidas por fumar y cáncer (Zhu, et al., 2016). Así entonces los constituyentes más importantes de ambas fases son las responsables de causar impresiones en el ADN; pero la sustancia que juega el rol principal es la nicotina, el químico encargado de la adicción al tabaco (Reynales, et al., 2017; Organización Mundial de la Salud, 2017).

2.2 El papel de la nicotina

La nicotina en sí no daña el ADN; no se sabe que las personas que usan parches de reemplazo de esta sufran los mismos daños que los fumadores; pero la nicotina es altamente adictiva, por lo que a muchas personas les resulta difícil dejar de fumar una vez que comienzan (Tontonoz, 2018).

La nicotina, es un alcaloide encontrado en las plantas del género *Nicotiana*, en la planta de tabaco, en la especie *Nicotiana Tabacum*. Es un potente veneno e incluso se usa en múltiples insecticidas (fumigantes para invernaderos). En bajas concentraciones, la sustancia es un estimulante, es el principal alcaloide tóxico del tabaco, representa el 90.95% de todos los alcaloides en el contenido, constituido por una amina terciaria, compuesta por una piridina y un anillo de pirrolidina con un grupo metilo. Actúa según la dosis, a dosis bajas es psicoestimulante, mejora la capacidad mental, sobre todo la concentración, y a dosis altas tiene un efecto sedante al actuar como depresor. Se encuentra en un porcentaje de 1 a 2 % en los

cigarrillos, de manera que un cigarrillo normal de 1 gramo contiene de 10 a 20 miligramos. El 10 % de esta nicotina pasa al humo del cigarrillo, es decir; de 1 a 2 miligramos (Aguilera y Quintero, 2016).

Se puede encontrar en dos formas, una no ionizada (31%) que al ser una base débil es hidrosoluble y liposoluble, con capacidad de absorberse rápidamente en el aparato respiratorio, la piel y la mucosa bucal, esta forma es la responsable de la dependencia farmacológica en los fumadores; y en su forma ionizada (69%), la absorción es escasa salvo cuando alcanza el pH más neutro de las vías broncopulmonares y se transforma en forma no ionizada, facilitando su absorción (Pérez, 1995).

El ingreso de la nicotina al organismo inicia con la inhalación, en los pulmones (de un 70% a un 90%), por la mucosa nasal y los plexos sublinguales (4% a 40%) que se comportan como una membrana semipermeable, e incluso a través de la piel, en este caso varía según la temperatura, el pH y la humedad cutánea. En las membranas biológicas de la boca, en función de la ionización de su pH, cuando el humo alcanza las vías pulmonares la nicotina se absorbe rápidamente independientemente del pH. Por lo tanto, las concentraciones de nicotina en sangre aumentan rápidamente mientras se está fumando, y alcanza un máximo cuando se acaba el cigarrillo (pasados 10 – 15 minutos). Una vez absorbida, la nicotina pasa al flujo sanguíneo y empieza a ionizarse; se distribuye extensamente de la sangre a los tejidos corporales, atraviesa la barrera hematoencefálica de manera rápida e intensa, llegando a los receptores en el plazo de 9 – 19 segundos (Aguilera y Quintero, 2016; Molero y Muñoz, 2005).

La nicotina en cerebro actúa sobre la subunidad β del receptor nicotínico ionotrópico de Acetilcolina (nACh), actúa predominantemente a nivel presináptico fomentando la descarga de neurotransmisores como la dopamina, noradrenalina y serotonina, neurotransmisores que tienen bajo su influencia la vía del sistema de recompensa cerebral: placer, excitación, alivio de la ansiedad, intensificación de la actitud de vigilancia, reducción del hambre, aumento del cortisol, aumento de la frecuencia y

gasto cardíaco, entre otros efectos. Al mismo tiempo una molécula del tabaco llamada Inhibidor de la Mono-amino-oxidasa (IMAO) bloquea a la enzima MAO (Mono-amino-oxidasa) que es la encargada de controlar el exceso de dopamina, prologando por tanto la acción de esta. La dopamina activa al hipotálamo centro de las reacciones emocionales y por lo tanto de los mecanismos del placer como se puede ver en la figura 4 (Aguilera y Quintero, 2016).

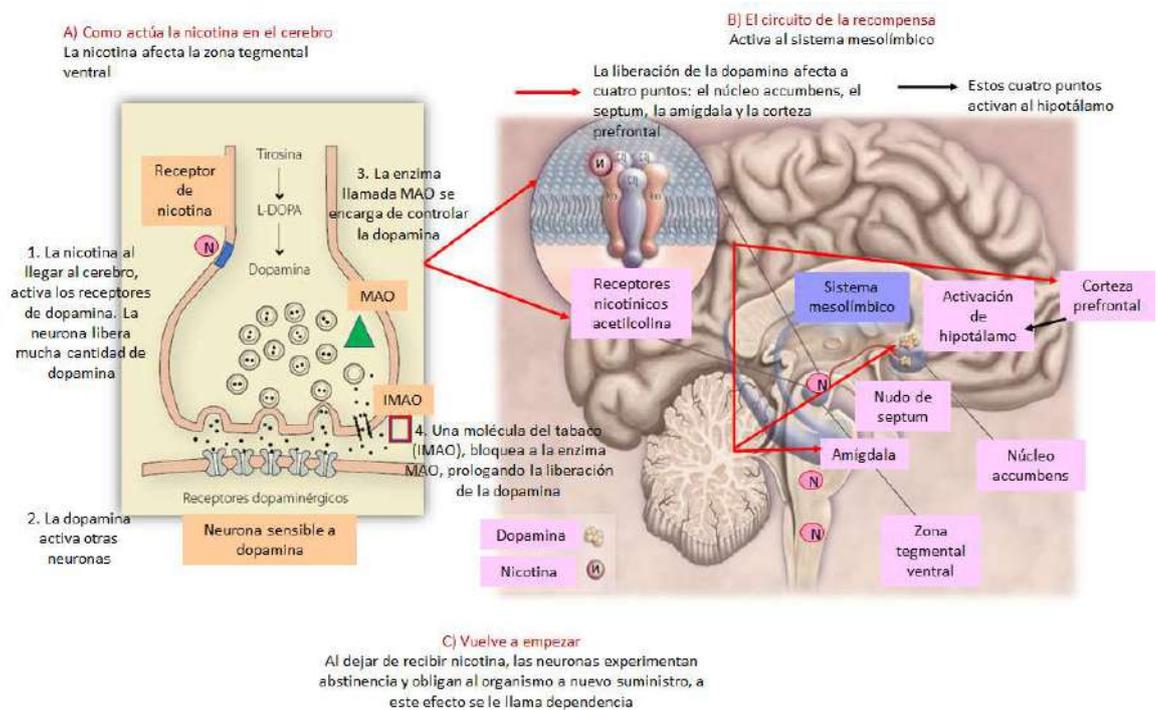


Figura 4. Efectos de la nicotina en el cerebro. Modificado de autor.

(Benowitz, 2010).

El metabolismo de la nicotina se produce principalmente en el hígado, aunque también pueden participar en la degradación el riñón y el pulmón. Los metabolitos primarios de la nicotina son la cotinina y la nicotina- N- óxido. La cotinina (compuesto no psicoactivo) tiene una vida media de 15-20 horas, y se considera el mayor metabolito in vivo de la nicotina. Un 9% de la nicotina se elimina sin modificarse, un 4% se transforma en nicotina-N-cotinina que se elimina por la orina

y un 70% lo hace en cotinina, de la cual un 10% se elimina sin metabolizar, un 21% lo hace en otros metabolitos y el 39% restante se transforma en 3-hidroxicotinina como se muestra en la figura 5 (Aguilera y Quintero, 2016).

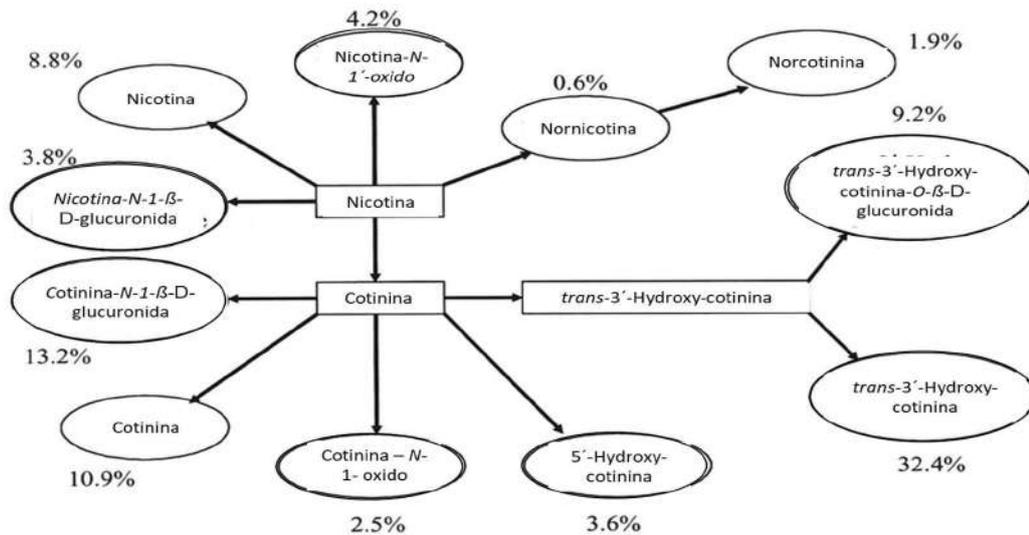


Figura 5. Disposición cuantitativa de la nicotina en fumadores. Modificado de autor (Balhara y Sarkar, 2016).

Con el uso reiterado del tabaco, el fumador va desarrollando tolerancia a la sustancia, esto es, que va a requerir fumar en mayor cantidad el tabaco para lograr sentir el mismo efecto que experimentaba cuando empezó a fumar, lo que provoca que siga fumando (Joehanes, et al., 2016).

Décadas después del cese, fumar cigarrillos confiere riesgo a largo plazo de enfermedades como algunos tipos de cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva y accidente cerebrovascular. Investigaciones recientes sobre el cáncer mencionan, que la carcinogénesis se desarrolla por la acumulación de eventos genéticos específicos (Aguilera y Quintero, 2016; Joehanes, et al., 2016).

Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos

principales de genes proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Estos cambios se llaman a veces "causantes" de cáncer (Weinberg, 2006).

Los proto-oncogenes se dedican al crecimiento y división celular normal. Sin embargo, cuando estos genes se alteran en ciertas maneras o son más activos de lo normal, pueden convertirse en genes causantes de cáncer (u oncogenes), al permitir a las células que crezcan y sobrevivan cuando no deberían (National Cancer Institute, 2015).

Los genes supresores de tumores se dedican también a controlar el crecimiento y la división celular. Las células con algunas alteraciones en los genes supresores de tumores pueden dividirse en una forma sin control (National Cancer Institute, 2015).

Los genes reparadores del ADN se dedican a arreglar un ADN dañado. Las células con mutaciones en estos genes tienden a formar mutaciones adicionales en otros genes. Juntas, estas mutaciones pueden causar que las células se hagan cancerosas (National Cancer Institute, 2015).

2.3 El cáncer

A nivel mundial, 70% de las muertes anuales (aproximadamente 38 millones de muertes) son causadas por ENT's que generalmente son crónicas, es decir, son de larga duración y progresan lentamente; las cuatro ENT principales son: las enfermedades cardiovasculares (17.7 millones de muertes), las enfermedades respiratorias crónicas (3.9 millones), la diabetes (1.6 millones) y el cáncer a veces también denominado neoplasia o tumor maligno que provoca cerca de 8 millones de muertes al año, lo que la convierte en una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Organización Mundial de la salud, 2018).

Cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas, es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células en todos sus tipos; algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos del derredor lo que le permite aparecer prácticamente en

cualquier lugar del cuerpo, a este proceso se le conoce como metástasis (National Cancer Institute, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2018).

La estratificación del cáncer refiere a la determinación de su fase según su ubicación, el tipo de células, tamaño del tumor, diseminación a ganglios u otros órganos, del aspecto de las células anormales y la probabilidad de crecimiento y diseminación del tumor. Bajo estos parámetros, hay cinco estadios:

- Estadio 0: No es cáncer, pero hay presencia de células anormales, sin diseminación, que pueden evolucionar a la enfermedad, se le conoce como Carcinoma in situ o CIS (National Cancer Institute, 2015).
- Estadio I, II y III: Hay cáncer presente. En cuanto más grande es el número, mayor es el tumor y tanto más se ha extendido en los tejidos cercanos (National Cancer Institute, 2015).
- Estadio IV: Metástasis, es decir, el cáncer que inició en un órgano ya se diseminó a partes distantes del cuerpo, generalmente hígado, pulmones o cerebro (National Cancer Institute, 2015).

Entre mayor sea el estadio, el pronóstico es más reservado sobre las posibilidades de curación (National Cancer Institute, 2015).

La OMS identificó que a nivel mundial en 2018 se diagnosticaron unos 3.8 millones de casos de cáncer y 1.4 millones de personas murieron por esta enfermedad. Los tumores malignos de próstata (21.7%), pulmón (9.5%), y colorrectal (8.0%) fueron los más comunes entre los varones y en mujeres de mama (25.2%), pulmón (8.5%), y colorrectal (8.2%), fueron los más comunes; estas tasas de incidencia no fueron diferentes de los tipos de cáncer registrados en México hasta el 2020, donde destaca el cáncer de mama como el más frecuente, seguido del de próstata; colon; tiroides; cervicouterino, y de pulmón como se muestra en la figura 6 (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2019; Organización Panamericana de la Salud, 2020; Secretaría de Salud, 2020).

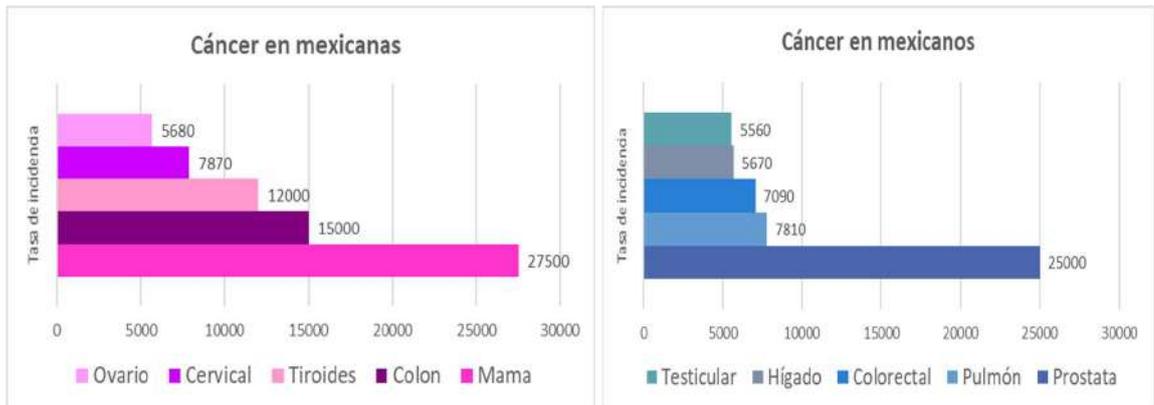


Figura 6. Tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad en mexicanas y mexicanos en México 2020. Modificada de autor (Organización Panamericana de la salud, 2020).

En el estado de Querétaro, el cáncer (tumores malignos) es una de las tres principales causas de mortalidad (Pineda, et al, 2020).

Se ha observado que a partir de los 20 años de edad se da un cambio significativo en las incidencias y tipo de cáncer que afecta a la población general. Es destacable que el cáncer en la población menor a los 20 años o infantil tiene su origen principalmente en las predisposiciones hereditarias y las mutaciones genéticas resultantes de la exposición a radiación ionizante, sustancias químicas y medicamentos a los que la madre estuvo expuesta durante la gestación. La principal diferencia entre el cáncer que se presenta en niños y adolescentes y el que se presenta en la edad adulta, es que se estima que aproximadamente 80% de los casos en adultos son prevenibles y, aproximadamente 30% de las defunciones por esta enfermedad se deben a cinco factores de riesgo relacionados con estilos de vida y de alimentación, elevado índice de masa corporal, falta de actividad física, bajo consumo de frutas y verduras, alcoholismo y tabaquismo (Instituto Nacional de Estadística y Geografía , 2017).

2.4 Etapas del cáncer

El cáncer es una enfermedad que sucede como resultado de un daño en el ADN (genético) y/o en los mecanismos de regulación de este (daño epigenético) y que resulta en una proliferación celular incontrolada. Cualquier fenómeno (“carcinógeno”) que dañe los genes en nuestras células –por ejemplo, a través de la producción de los destructivos “radicales libres” – puede ocasionar cáncer. Pero para que la célula se torne cancerosa (“transformación cancerosa”) ha de considerarse daño en varios genes causantes de cáncer en la misma célula. Es decir, los genes alterados tienen que formar parte de unos procesos característicos o microambiente, o huellas, inherentes a la propia formación del cáncer: proliferación celular (o en sus inhibidores), resistencia a la muerte celular e inmortalidad, formación de vasos sanguíneos, capacidad de diseminación, reprogramación energética y evasión al sistema inmune. Este proceso se da con tres signos distintivos que se muestran en la figura 7: Iniciación, promoción y progresión (Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2019).

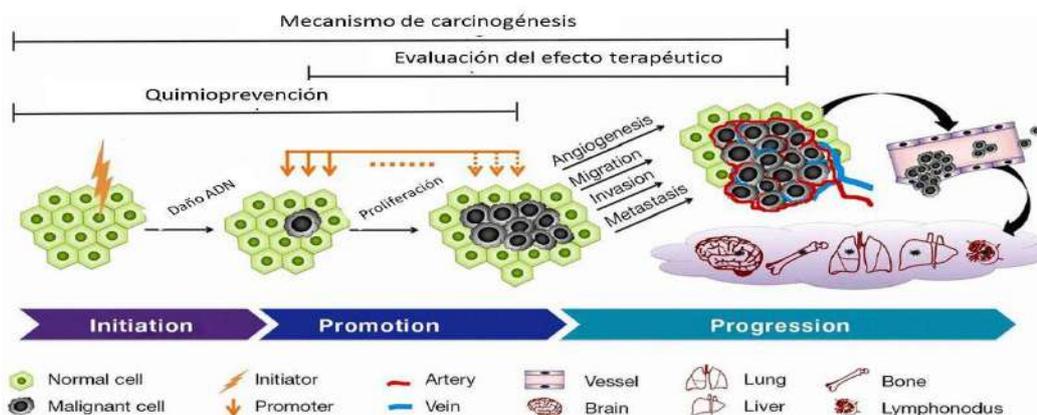


Figura 7. Proceso de las tres fases de la carcinogénesis.

Modificado de autor (Liu, et al., 2015).

a) Iniciación es el primer paso en el desarrollo del cáncer, es un proceso irreversible y es llevado a cabo por sustancias químicas conocidas como carcinógeno o

iniciadores los cuales son productos químicos que a menudo no reaccionan directamente con el ADN, pero que pueden ser modificados y causar mutaciones (Liu, et al., 2015). A veces se induce por causas internas al organismo, como hormonas, infecciones, mutaciones o inflamación crónica. Otras muchas veces la causa se halla en factores externos, como las radiaciones o los agentes químicos (como los contenidos en el tabaco) (Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2019). Estos carcinógenos se pueden clasificar en directos, capaces por sí mismos de causar lesiones neoplásicas a las dosis apropiadas, e indirectos, que necesitan de una activación metabólica previa para actuar como verdaderos carcinógenos (Liu, et al., 2015). Los efectos iniciales producidos por los carcinógenos son causa de alteraciones de la replicación (el carcinógeno se une al ADN y se sintetizan cadenas anormales de ADN), transcripción (se produce una inhibición precoz de la síntesis de ADN), traducción (inhibición de la síntesis proteica) y la regulación de los ácidos nucleicos (Osborne, et al, 2015).

b) La promoción es el segundo paso que ocurre en aquellas células ya mutadas que aprovechan la ventaja proliferativa otorgada por el iniciador y estimula a las células a dividirse (Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2019). A diferencia de los iniciadores, los promotores no se unen covalentemente a macromoléculas o ADN dentro de la célula, pero muchos se unen a receptores en la superficie celular para afectar las vías intracelulares que aumentan la proliferación celular. Existen dos categorías de promotores: promotores específicos que interactúan con receptores sobre o en células diana y promotores no específicos que alteran la expresión génica sin implicar un receptor conocido. Los promotores no necesariamente causan cáncer por sí mismos, sino que aumentan la expresión de las células iniciadas y, en última instancia, conduce a la malignidad (Liu, et al., 2015). Mientras que el riesgo de crecimiento de tumor con aplicación promotora depende de la dosis, dosis muy bajas de promotores no llevarán al desarrollo de tumor y dosis muy altas no producirán más riesgo que niveles moderados de exposición (Weinberg, 2006).

Los factores iniciadores y promotores son responsables del 20-40% de las muertes

humanas por cáncer procedentes del tabaco (Liu, et al., 2015). Un compuesto que actúa tanto como iniciador como promotor es denominado un "carcinógeno completo" porque el desarrollo de tumor puede ocurrir sin la aplicación de otro compuesto (Weinberg, 2006).

c) La progresión del tercer paso se refiere a las transformaciones en serie de un tumor benigno a una neoplasia con malignidad. La progresión se asocia con cambios cariotípicos ya que la mayoría de los tumores avanzados muestran aneuploidía con el número incorrecto de cromosomas. Este cambio cariotípico se acompaña de una mayor tasa de crecimiento, invasividad, metástasis y alteraciones en la bioquímica y la morfología debido a las continuas mutaciones e inestabilidad genética. Una vez que este paso se activa, la progresión es irreversible y sin este, el tumor puede permanecer benigno y localizado (Liu, et al, 2015; Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2019).

Además, destruye la membrana basal y matriz extracelular para abrirse camino hacia los vasos sanguíneos y linfáticos y así metastatizar. Por otra parte, con el fin de sustentar su propio aporte de nutrientes, desarrolla un sistema de vasos sanguíneos propios (angiogénesis tumoral) (Wojtczyk y Schlichtholz, 2019).

The Cancer Genome Atlas (TCGA) reveló una mayor frecuencia de mutaciones en los fumadores de por vida que en los no fumadores, por tanto, las deleciones parciales y variaciones en el número de copias se proponen como causas de cáncer (Wojtczyk y Schlichtholz, 2019).

Si bien la carcinogénesis se considera ahora como un evento clonal que comienza con mutaciones somáticas que activan proto-oncogenes e inactivan supresores tumorales, un proceso epigenético o de no cambio en la secuencia genética también se ha implicado en el inicio del cáncer (McMahon, et al., 2017).

La palabra "epigenética" es el estudio de los cambios en la función génica que son heredables mitóticamente y / o meióticamente y que no implican un cambio en la secuencia de ADN. El término ha evolucionado para incluir cualquier proceso que altere la actividad génica sin cambiar la secuencia del ADN y conduce a

modificaciones que pueden transmitirse a las células hijas (aunque actualmente se sabe que algunos cambios epigenéticos pueden ser revertidos) (Biswas y Rao, 2017; Cardial , et al. 2019).

En la actualidad, las alteraciones epigenéticas más estudiadas asociadas con el fenotipo neoplásico son:

- Modificaciones postraduccionales de las histonas que facilitan o impiden la asociación de proteínas reguladoras y factores de transcripción con el ADN.
- Remodelado de la cromatina por factores dependientes de ATP que desplazan o desestabilizan los nucleosomas, exponiendo u ocultando al ADN a las interacciones de los factores de transcripción.
- Alteraciones en la metilación del ADN / ARN, las cuales tienen una estrecha relación con la inactivación transcripcional.
- Los ARN no codificantes (Biswas y Rao, 2017; Delgado, 2009; Lu, et al., 2017).

Todos ellos se consideran marcadores del inicio y la progresión del cáncer y en último término decide qué funciones están activas y cuáles inactivas en cada tejido específico (McMahon, et al., 2017).

2.5 La metilación

Los múltiples tipos de modificaciones epigenéticas existentes conducen a un nivel complejo y dinámico de interacciones y estructuras proteína-ADN que permiten la regulación de la expresión de genes a corto y a largo plazo. En las células eucariontes el ADN se encuentra confinado en el núcleo y plegado parcialmente en un complejo proteína-ADN denominado «nucleosoma». Este nucleosoma está constituido por un octámero de proteínas llamadas histonas (H3, H4, H2A, H2B). Las histonas se estructuran en dos dominios: una región central plegada, que interacciona con aproximadamente 147 pb de ADN, formada por una hélice α larga, flanqueada por dos hélices α cortas, y un dominio N-terminal poco estructurado, de 15 a 30 residuos, denominado “cola de histonas”; el dominio N-terminal es flexible

y sale fuera del núcleo central o “core” del nucleosoma; dicha estructura por tanto, puede ser transformada por modificaciones tanto a nivel del ADN como de las histonas, generando regiones del ADN expuestas en mayor o menor grado a la maquinaria transcripcional modificando la función de los genes (Krause, et al., 2016; Lai y Pugh, 2017; McMahon, et al., 2017). Las interacciones histona-ADN se restringen a la columna de enlaces fosfodiéster de las hebras del ADN en la superficie interna de la superhélice; hay interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con el fosfato y contactos no polares con la desoxirribosa. Debido a esto y a que no interactúan con las bases del ADN, las histonas pueden empaquetar cualquier ADN, sin importar su secuencia (Youl y Kim, 2020).

La metilación del ADN es una modificación epigenética del genoma que participa en la regulación de la expresión génica y la estabilidad del genoma. El estado de metilación puede modificarse por factores genéticos y ambientales, y puede integrar los efectos tanto del gen como del medio ambiente en un fenotipo o enfermedad. Fue hasta el uso generalizado de tecnologías de metilación en todo el genoma que se descubrieron cientos de marcadores de metilación relacionados con el tabaquismo y sus relaciones con enfermedades relacionadas con el tabaquismo se evaluaron (Zhu, et al., 2016).

El tabaquismo persistente tiene efectos duraderos sobre la metilación del ADN, y muchos estudios de asociación de todo el epigenoma (EWAS) han identificado y replicado señales metiladas diferencialmente relacionadas con el tabaquismo en poblaciones con la mayoría encontrada en muestras de sangre completa, células bucales y tejido pulmonar. La mayoría de las señales de metilación del tabaquismo muestran niveles más altos de metilación del ADN en los fumadores actuales en comparación con los no fumadores, y una dinámica variable al dejar de fumar. Aunque algunas alteraciones persisten durante décadas, dejar de fumar puede provocar que los niveles de metilación vuelvan a los observados en los no fumadores. Sin embargo, la mayoría de los exfumadores exhiben niveles intermedios de metilación entre los no fumadores y los fumadores actuales. Los niveles de metilación se correlacionan con la dosis acumulada de fumar y están

asociados con el tiempo transcurrido desde que se dejó de fumar (Tsai, et al., 2018). La metilación del ADN es actualmente reconocida como una marca epigenética crítica involucrado en las diferentes etapas de enfermedades como el cáncer, incluso en las primeras etapas precancerosas, en contraste la hipometilación del genoma completo se ha mostrado como un proceso continuo durante toda la vida del tumor (McMahon, et al., 2017).

2.5.1 SAM (S-adenosilmetionina)

El grado de expresión de un gen se da en parte por mecanismos epigenéticos, y estos pueden alterarse como consecuencia de las influencias ambientales, como el estado nutricional; esto es especialmente relevante en enfermedades complejas como el cáncer, la diabétes o enfermedades cardiovasculares. Los grupos metilo son adquiridos a través de la dieta y son donados al ADN a través de la vía del folato y la metionina. Los factores dietéticos son fundamentales para formar a la S-adenosilmetionina (SAM), que es el mayor donante biologico de metilo. La formación de SAM implica tres vías bioquímicas interrelacionadas: el ciclo del folato, el ciclo de la metionina y la vía de la transulfuración que se encuentran presentadas en figura 8.

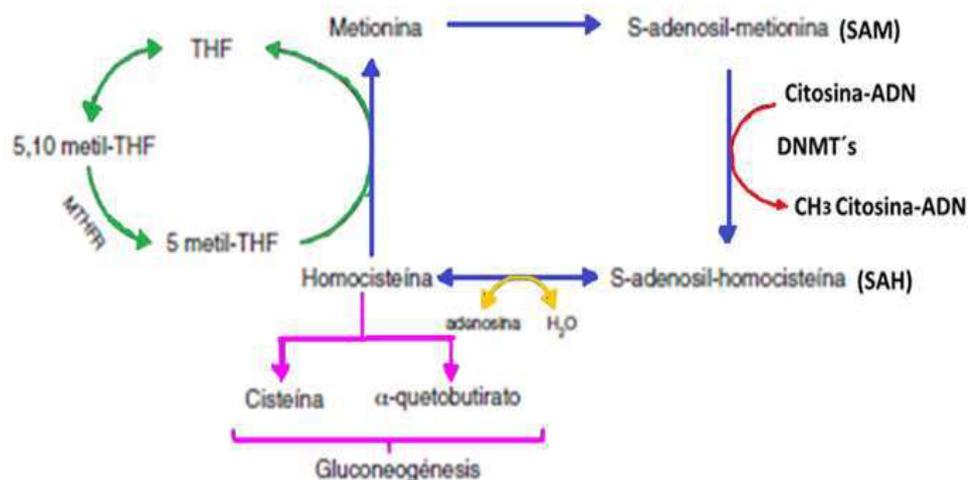


Figura 8. Ciclos del folato, la metionina y la transulfuración. Modificado de autor (Guardiola, et al., 2015).

- Ciclo del folato: El folato es una vitamina B hidrosoluble cuya forma activa es el tetrahidrofolato (THF) que se utiliza en la formación de purinas y pirimidinas, y la remetilación de homocisteína a metionina. THF es convertido a 5-metil-THF por la enzima Metil-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) (Guardiola, et al., 2015).
- Ciclo de la metionina: La metionina es un aminoácido convertido a SAM por MAT, cuando SAM dona su metilo, se forma la S-adenosil-homocisteína (SAH), y tras la liberación del grupo adenosil, obtenemos la homocisteína. Este último puede ser remetilado a metionina por la donación del grupo metilo de la 5-metil-THF, o puede ser catabolizado a cisteína a través de la vía de la transulfuración (Guardiola, et al., 2015).
- Vía de la transulfuración: La homocisteína puede ser convertida en cisteína y α -Quetobutirato, que tras varias reacciones serán convertidos en piruvato y succinil CoA necesarios en la gluconeogénesis. Una baja en la producción de 5-metil-THF se asocia a niveles altos de homocisteína e hipometilación del ADN. La ratio SAM/SAH define el potencial de metilación de una célula. La hiperhomocisteinemia disminuye esta ratio y hace disminuir el potencial metilador (Guardiola, et al., 2015).

La metilación dependiente de SAM es fundamental para muchos procesos biológicos y su nivel estacionario ha sido aceptado como marcador crítico de metilación genómica; siendo alto en células quiescentes y bajo en células en proliferación. SAM se sintetiza a partir de la metionina y ATP en una reacción catalizada por la metionina adenosiltransferasa (MAT). En mamíferos, MAT está codificado por dos genes, MAT1A y MAT2A. MAT1A codifica una sola subunidad alfa1 de MAT I y MAT III (forma tetramérica y dimerica respectivamente), MAT1A se expresa únicamente en células hepáticas maduras, abarca 3217 nucleótidos y codifica una proteína de 395 residuos de aminoácidos. MAT II consta de dos restos altamente homólogos codificados por MAT2A y se expresa en todos los tejidos. La actividad MAT se compone de dos pasos; la primera reacción transfiere el resto adenosilo a metionina, y la segunda reacción escinde el tripolifosfato un cambio en la expresión de alguno de ellos es frecuentemente observado en la transformación

maligna de las células normales a cancerígenas (Furujo, et al., 2018).

2.5.2 Metilación de histonas

Se han encontrado al menos ocho tipos de modificaciones postraduccionales en las histonas que participan en el estado de compactación de la cromatina; las más conocidas son acetilación, metilación y fosforilación o ubiquitinización. La metilación que es catalizada por enzimas metiltransferasas (HMTs) y demetilasas (HDMTs), puede ser mono, di o tri metil lisina (K-me1, K-me2, K-me3), o mono o dimetil arginina (R-me1, R-me2) como se muestra en la figura 9. Las distintas modificaciones de las histonas actúan de forma combinada para formar el denominado “código de las histonas”, las cuales pueden iniciar respuestas biológicas como activación o represión de la transcripción. La metilación de histonas es catalizada por tres familias distintas de enzimas, a saber, la familia de proteínas que contienen el dominio SET, la familia de proteínas que no son del dominio SET y la familia PRMT1 (proteína arginina metiltransferasas). En general, los genes transcripcionalmente inactivos presentan bajos niveles de acetilación, metilación y fosforilación, mientras que la eucromatina transcripcionalmente activa tiene niveles elevados de acetilación, las principales marcas de modificaciones de histonas están resumidas en la tabla 1 (Biswas y Rao, 2017; Delgado, 2009; Guardiola, et al., 2015).

Tabla 1. Principales modificaciones de las histonas (Guardiola et al., 2015).

Modificación	Papel en la transcripción	Histona	Residuo modificable
Acetilación	Activación	H3	K9, K14, K18, K56
		H4	K5, K8, K12, K16
		H2A	K5
		H2B	K6, K7, K16, K17
Metilación	Activación	H3	K4, K36, K79
	Represión	H3	K9, K27
		H4	K20
Fosforilación	Activación	H3	S10
Ubiquitinización	Activación	H2B	K120
	Represión	H2A	K119

El número se refiere al número de aminoácido en la cadena de la histona.
K: residuo de lisina, S: residuo de serina.

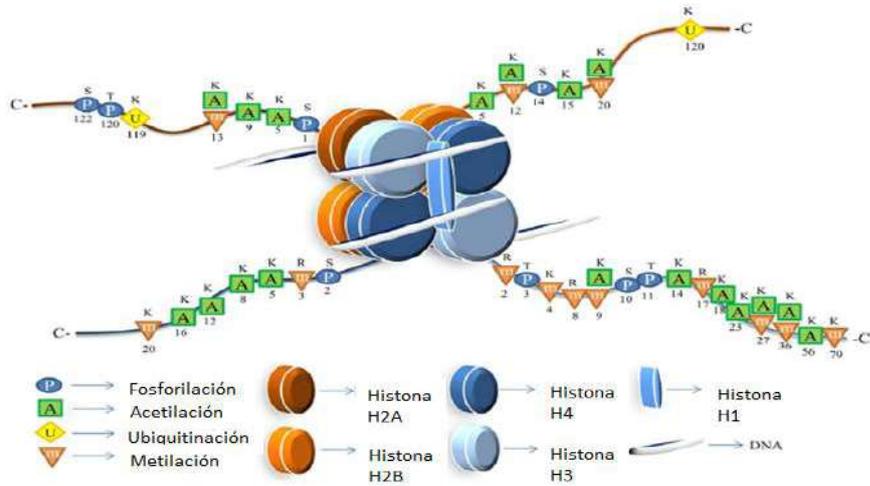


Figura 9. La histona y sus modificaciones. Modificada de autor (Biswas y Rao, 2017).

En la figura 10 se muestra el reordenamiento de la cromatina en el núcleo de las células con cáncer y su relación con la metilación de las histonas.

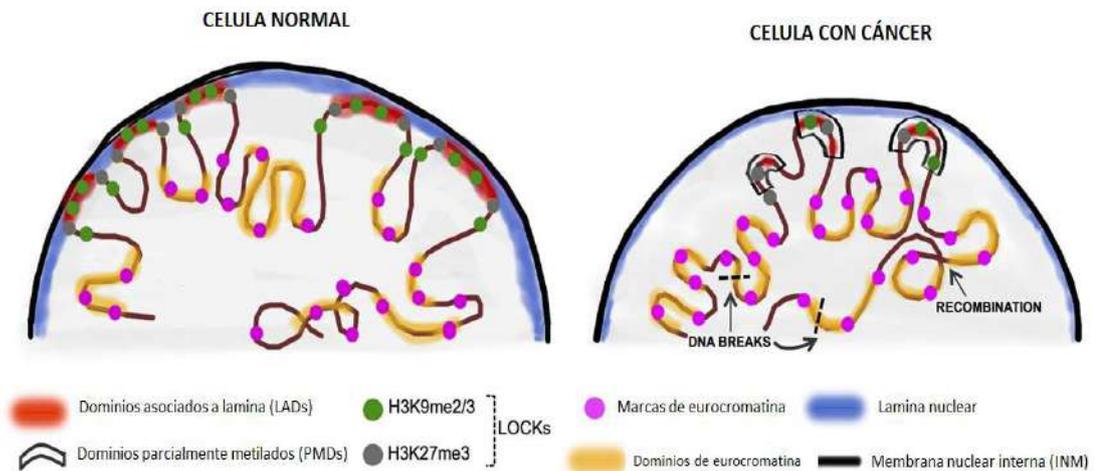


Figura 10. Reordenamiento de la cromatina en el núcleo de las células con cáncer. Modificado de autor (Madakashira y Sadler, 2017).

- En las células diferenciadas normales, la heterocromatina se organiza en la periferia nuclear uniéndose a las proteínas de la lámina nuclear (en azul) y se organiza en dominios asociados a lamina (LAD) (en rojo) que se superponen significativamente con LOCK o regiones largas de cromatina marcadas por metilación de histonas en lisinas (H3K9me2 / 3 y H3K27me3- círculos verdes y grises). Los dominios activos están marcados por las marcas de histonas de eucromatina (círculos rosas).
- Las células cancerosas muestran reordenamiento de la cromatina nuclear con disminución de la expresión en la lámina, aumento de la eucromatina y pérdida significativa de LAD y LOCK. Grandes bloques de ADN denominados PMD (dominios parcialmente metilados) coinciden en gran medida con LAD y LOCK. Estos eventos pueden conducir a eventos de recombinación de ADN aleatorios, así como la cromatina abierta menos estable que proporciona “puntos calientes” para roturas de ADN (líneas discontinuas negras) (Luperchio, et al., 2014; Madakashira y Sadler, 2017).

2.5.3 Metilación de ARN no codificante (ncARN)

Solo menos del 2% del genoma humano se utiliza para codificar proteínas, la mayoría del genoma de mamífero se transcribe activamente para producir grandes cantidades de ARN no codificantes (ncARN). Los ARN no codificantes, son moléculas de ARN funcionales que, aunque no codifican para proteínas, son clave en la regulación génica. Los ncARN no producen cambios sobre la molécula de ADN a diferencia de la metilación de histonas y del ADN, sino que se encargan de controlar la expresión génica de manera postranscripcional uniéndose a ARN mensajeros (ARNm) diana, y de esta forma promoviendo o bien su degradación, o inhibiendo su traducción, impidiendo en ambos casos la expresión génica. Los dos tipos principales de ncARN son micro ARN (miARN) y ARN largo no codificante (lncARN) (Biswas y Rao, 2017; Guardiola, et al., 2015; Li, 2016).

- Los miARN (16 a 22 nucleótidos) son una clase de ncARNs recientemente descubierta y bien caracterizada, se encargan de ajustar y dirigir finamente la traducción de hasta un 60% de los genes codificantes de proteínas en humanos, generalmente en el citoplasma, y a menudo se desregula en diferentes tipos y subtipos de cáncer ver figura 11 (Biswas y Rao, 2017; Guardiola, et al., 2015; Li, 2016).

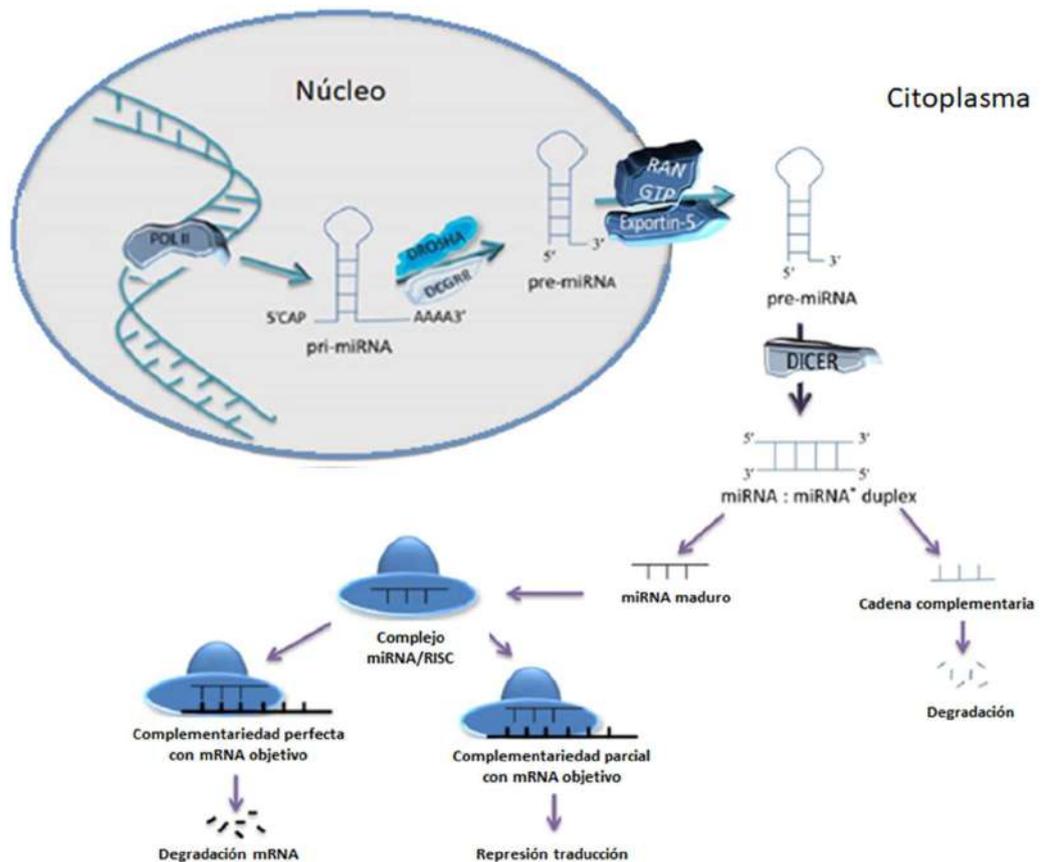


Figura 11. Mecanismo de acción de miARN's. Modificado de autor (Biswas y Rao, 2017).

- Los lncARN (200 nucleótidos) también funcionan como reguladores genéticos, pero básicamente dentro del núcleo celular. Aunque muchos estudios han demostrado la desregulación de la expresión de ncARN en varias enfermedades, la regulación epigenética de ncARNs sigue siendo poco conocida en diferentes tipos de cáncer y subtipos de cáncer. Se han observado alteraciones epigenéticas generalizadas como la hipermetilación de los promotores de los ncARN que provocan el silenciamiento de miARN y por tanto la inactivación transcripcional en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo en el cáncer de mama; a diferencia de los genes que codifican

proteínas, la mayoría de los ncARNs mal regulados epigenéticamente se compartieron entre los subtipos de cáncer de mama, pero se producen un subconjunto de cambios transcriptómicos y epigenéticos correspondientes de un modo específico de subtipo (Biswas y Rao, 2017; Guardiola, et al., 2015; Li, 2016).

- Investigaciones recientes han mapeado la presencia de genes miARN en las regiones comunes de punto de ruptura de oncogenes y genes supresores de tumores y regiones frágiles del genoma que son sitios preferenciales para la delección, translocación o amplificación, lo que sugiere su participación en la conducción del comportamiento del crecimiento tumoral (Biswas y Rao, 2017; Guardiola, et al., 2015; Li, 2016).
- miRNA sirve como parte de la red reguladora que participa en el silenciamiento de la expresión génica por metilación y la modificación de la estructura de la cromatina. Aunque se han identificado varios miARN hasta la fecha, mir-127 fue el primer microARN regulado epigenéticamente asociado con el cáncer (Biswas y Rao, 2017; Guardiola, et al., 2015; Li, 2016).
- Por otro lado, también se ha establecido una perspectiva diferente de miRNA para controlar la metilación del ADN y la modificación de la histona, es decir, son capaces de dirigirse a los genes que regulan la vía epigenética creando una vía de retroalimentación altamente organizada (Biswas y Rao, 2017; Guardiola, et al., 2015; Li, 2016).
- Una expresión anormal de estos microARN, llamados epimiARN, se ha asociado con varias enfermedades. Los estudios han identificado numerosos miARN que controlan la estructura de la cromatina al alterar las enzimas histona desacetilasa y los genes relacionados con el grupo polycomb. Además, una familia de miRNAs (miR-29) regula la expresión de ADN de mantenimiento metiltransferasas DNMT3a y DNMT3b (Biswas y Rao, 2017; Guardiola, et al., 2015; Li, 2016).

2.5.4 Metilación de ARN

Aún se conoce poco de la influencia de la metilación sobre esta modificación postraduccional que puede tener lugar en diferentes posiciones en el nucleótido de tARN (de transferencia), mARN y rARN (ribosomal). La metilación del ARN tiene diferentes consecuencias funcionales como estabilización, aumento en la función y control de calidad. Uno de los principales residuos modificados es la metilación en posición 6 de la adenosina (m6A), proceso en el que SAM también es donador del grupo metilo. Esta modificación también ha sido asociada con diferentes tipos de cáncer, obesidad y enfermedades mentales (McMahon, et al., 2017, Romanek, et al., 2016).

2.5.5 Metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso epigenético que juega un papel importante en el ciclo celular de células sanas y cancerosas, su función principal es la protección de la integridad del genoma y la regulación de la expresión génica (McMahon, et al., 2017, Romanek, et al., 2016).

En las células normales, la metilación contribuye a diferentes alternancias epigenéticas como: inactivación o inestabilidad cromosómica por lo general en la hipometilación, por ejemplo para mantener el silenciamiento de ciertos genes durante los procesos de diferenciación celular; y en el caso general de la hipermetilación donde colabora con la inactivación de la cromatina, expresión específica del tejido, impronta genética, o silenciamiento de los elementos transponibles para evitar mutaciones (Romanek, et al. 2016).

La metilación del ADN como se muestra en la figura 12, es un mecanismo que se produce mediante la adición de un grupo metilo (CH₃) al ADN, modificaciones, como la oxidación de citosina metilada (5-mC) a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), 5-formilcitosina (5-fC), 5-carboxilcitosina (5-caC) y la metilación de adenina (A) a N6-metiladenina (6-mA) se está identificando como reguladores epigenéticos importantes; el proceso de metilación de ADN más ampliamente caracterizado y

que representa la mayor modificación epigenética del genoma humano, es la adición covalente del grupo metilo en el carbono 5 del anillo de pirimidina de la citosina que da como resultado 5-metilcitosina (5-mC), también informalmente conocida como la "quinta base" del ADN. Estos grupos metilo se proyectan en el surco principal del ADN e inhiben la transcripción por impedimento físico (Kumar, et al., 2018; Romanek, et al., 2016; What is Epigenetics, 2016).



Figura 12. Metilación de citosina a 5-Metilcitosina. Modificado de autor (Kumar, et al., 2018).

En el ADN humano, más del 4% de las citosinas presentes en el genoma están metiladas. En las células somáticas, más del 80% de la citosina presente en el contexto de la metilación simétrica pareada de un sitio CpG está metilada; en el que un nucleótido Citosina está situado junto a una Guanina; aunque también se puede encontrar en otros contextos simétricos (CHG) y asimétricos (CHH, donde H es A, T o C) (Kumar, et al., 2018; What is Epigenetics, 2016).

Los dinucleótidos CpG suelen estar repartidos heterogéneamente por todo el genoma, pero las zonas del genoma conocidas como islas CpG (CGIs), es en dónde la frecuencia de estos dinucleótidos CpG es unas 10 veces mayor en comparación con la media del genoma. Típicamente una CGI tiene al menos 200 pares de bases con más del 50% de contenido de guaninas y citosinas y una proporción de CpG mayor del 60%, que es una característica central y evolutivamente conservada en estos sitios. Las CGIs suelen localizarse cerca de los sitios de inicio de la transcripción, en las regiones reguladoras 5' de muchos genes y por eso suelen

asociarse con la región promotora de los genes. La metilación de las CGIs se ha asociado a represión de los genes debido a que la presencia de citosinas metiladas produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN que dificulta la unión de factores de transcripción e incluso la propia transcripción. Los promotores de los genes están normalmente desmetilados y juegan un papel clave al controlar la regulación génica (Guardiola, et al., 2015; Kumar, et al., 2018; Long, et al., 2016). El perfil de metilación del ADN y la regulación de la expresión génica son específicos de cada tejido y cada célula; en el caso del cáncer, por ejemplo, las CGIs de un promotor de un gen de reparación adquieren hipermetilación anormal como se observa en la figura 13, lo que resulta en el silenciamiento transcripcional que puede ser heredado por las células hijas tras la división celular (McMahon, et al., 2017).

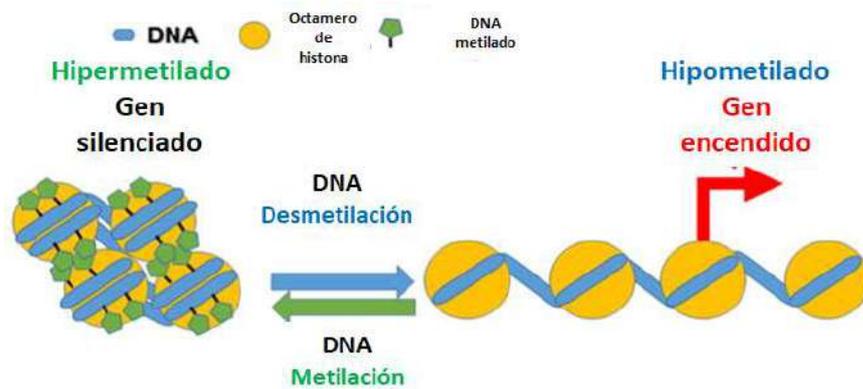


Figura 13. Los estados de la cromatina regulados por la metilación del ADN.

Modificado de autor (McMahon, et al., 2017).

Además de las CGIs asociadas al promotor, se han identificado una clase adicional de elementos hipometilados lejos de los promotores génicos que parecen funcionar como elementos reguladores de genes distales, a menudo englobando potenciadores. Estas regiones tienden a ser hipometiladas en un subconjunto de tejidos, lo que sugiere que los mecanismos subyacentes a su estado de metilación pueden diferir de la de los clásicos asociados a promotor CGIs; estas regiones

hipometiladas están asociadas con promotores débiles que experimentan cambios en la metilación del ADN durante el desarrollo (Guardiola, et al., 2015; Long, et al., 2016).

Recientes evidencias indican que la metilación de las citosinas también puede producirse en zonas no asociadas a promotores (aunque cercanas), tienen lugar en las regiones adyacentes a las CGIs, la denominada "orilla de islas CpG o islands shores"(a 2 kb flanqueando las CGIs) e incluso que no está limitada a los dinucleótidos CpG, sino que también se ha descrito en los dinucleótidos CpA, esta hipermetilación se da de forma diferencial en el cáncer (Guardiola, et al., 2015; Long, et al., 2016).

La metilación de CpG puede suprimir la transcripción en general por dos mecanismos. En primer lugar, la presencia del grupo metilo en un CpG específico puede bloquear directamente el reconocimiento del ADN por los factores de transcripción y alternativamente, otros factores proteicos como las Methyl-CpG-binding domain proteins, pueden unirse preferentemente al ADN metilado, bloqueando el acceso al factor de transcripción, y en segundo lugar de manera indirecta es propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina (McMahon, et al., 2017). El ADN eucariótico largo se envuelve alrededor de las proteínas histonas, lo que da lugar a cromosomas compactos. La estructura compacta del nucleosoma resultante principalmente de la interacción iónica y de hidrógeno entre las histonas con carga alta positiva (alcalinas) y la cadena ácida principal del ADN con los oxígenos de carga negativa de los grupos fosfato, restringe el acceso de la maquinaria transcripcional (. Los nucleosomas apretados pueden "aflojarse" cuando la carga positiva de los residuos de lisina en la superficie de la histona se neutraliza mediante la desmetilación (mediante proteínas como MBD2b) y acetilación realizada por la histona acetilasa (HAT), esto permite la accesibilidad a la maquinaria basal, lo que da como resultado la expresión génica. Por otro lado, la recuperación de una carga positiva en la cadena lateral de lisina de la superficie de la histona resultante de la acción de la histona desacetilasa (HDAC) y metilación por DNMT's, restaura una estructura compacta de la cromatina, dificultando el acceso de los factores de

transcripción y, por lo tanto, disminuyendo la represión génica. Esta mediación de la expresión génica por acetilación-hipometilación y desacetilación- hipermetilación de histonas (un tipo de modificación postraduccional) es un importante sistema de regulación de la expresión génica en muchos eucariotas, comúnmente denominado control epigenético de la transcripción génica eucariota. La alteración del equilibrio entre las actividades de HAT, HDAC y DNMT's, puede resultar en la expresión aberrante de un gen específico que finalmente conduce a la inestabilidad de la estructura cromática y enfermedades (Youl y Kim; 2020).

Esto ilustra como la metilación del ADN puede impedir físicamente la unión de los reguladores transcripcionales al gen y, lo que es más importante, el ADN metilado participa en la formación de cromatina mediante interacciones con otras modificaciones epigenéticas como el código de histonas, posicionamiento de nucleosomas, ARN no codificante, y las proteínas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP. Las colas de histona al experimentar una variedad de modificaciones covalentes regulan el proceso celular clave como la transcripción génica, la replicación del ADN y la reparación del ADN. Durante el desarrollo de mamíferos y el cáncer, la metilación del ADN y las modificaciones específicas de las histonas parecen influirse recíprocamente: la metilación de la histona puede dirigir los patrones de metilación del ADN y la metilación del ADN puede servir como plantilla para el establecimiento de ciertas modificaciones de la histona después de la replicación del ADN (Kumar, et al., 2018). Esto se debe a que existe una relación funcional por unas proteínas de unión con el ADN metilado llamadas Methyl-CpG-binding domain proteins o MBD, que atraen a complejos de histona deacetilasa e histona metiltransferasas hacia la cromatina. La familia de proteínas MBD consta de cinco miembros (MECP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4) y están asociadas a regiones silenciadas por hipermetilación del ADN y la proteína de unión a metil citosina 2 (MECP2). Además de estos, otras proteínas que contienen MBD son MBD5 / 6, SETDB1 / 2 y BAZ2A / B. La proteína MBD emplea enzimas modificadoras de histonas y complejos de remodelación de cromatina en sitios metilados y facilita la represión transcripcional (Biswas y Rao, 2017; Subhankar y

Rao, 2017).

El complejo de remodelación de la cromatina como NuRD se une con la proteína MBD2 y el ADN metilado. Estos mecanismos juegan un papel central en el establecimiento del papel crítico de la metilación del ADN en la regulación de genes epigenéticos (Biswas y Rao, 2017; Subhankar y Rao, 2017).

El ADN metilado está presente principalmente en regiones genómicas repetitivas (incluido el ADN satelital, como microsatélites y minisatélites), dentro de centrómeros y elementos parásitos como elementos transponibles intercalados cortos (SINE) y elementos transponibles intercalados largos (LINE) donde funcionan para silenciar genes y regiones genómicas no codificantes (Biswas y Rao, 2017; Subhankar y Rao, 2017).

En contraste, los genomas de los gametos y las células cuyas regiones promotoras están menos enriquecidas con las islas CpG a menudo se metilan durante el desarrollo temprano. Sin embargo, debemos tener en cuenta que estos genes exhiben un control de expresión distinto durante el desarrollo y siempre son específicos del tejido (Biswas y Rao, 2017).

De manera general, por tanto, podemos visualizar hipermetilación de genes supresores de tumores y la hipometilación de oncogenes. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea, en general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobreexpresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis (McMahon, et al., 2017).

Mientras que algunos muestran de manera convincente una relación directa e inversa entre la expresión génica y la metilación del ADN de una región reguladora, la mayoría no lo hace. De hecho, la mayoría de las CpG metiladas residen en regiones intergénicas y la mayoría de las regiones metiladas diferencialmente (DMR) entre las células normales y cancerosas se encuentran en estas regiones. Los DMR en el cáncer no son en gran medida focales, sino que se extienden por amplias regiones del genoma. En algunos casos, estos DMR representan una

pérdida parcial de metilación en una región grande (es decir, PMD) como se puede ver en la figura 14. La reorganización del metiloma en el cáncer refleja un cambio masivo en la distribución de la heterocromatina y la organización nuclear, y que esta reorganización puede controlar indirectamente la expresión génica (Baylin y Jones, 2011, Madakashira y Sadler, 2017).

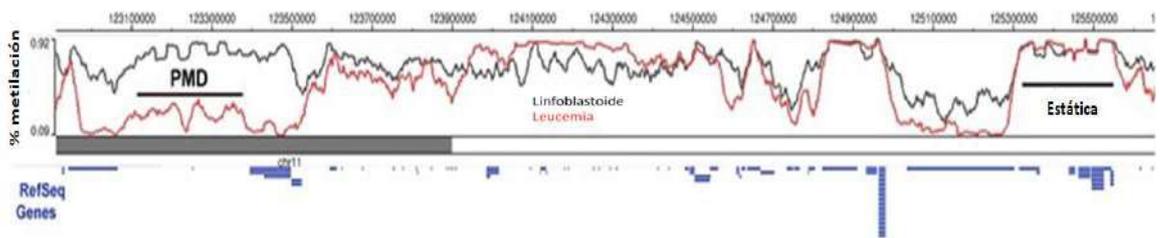


Figura 14. PMD en células con cáncer comparado con células normales.
Modificado de autor (Madakashira y Sadler, 2017).

Los picos de metilación en células normales se caracterizan por tramos con más del 80% de metilación de la mayoría de los CpG. Estos se convierten en PMD, definida como una región de 5 kb a 10 Mb con una metilación de CpG promedio del 50%. La aparición de PMD esencialmente aplanan el panorama de metilación en las células cancerosas, difuminando los límites entre lo que en las células normales constituyen valles de metilación (CGI) y picos (costas CGI) (Madakashira y Sadler, 2017).

2.5.6 Metiltransferasas (DNMT's)

El patrón de metilación en los mamíferos se establece durante el desarrollo embrionario; mientras se forma el cigoto tiene lugar una desmetilación del ADN de las células germinales, y la metilación se reemprende durante las divisiones celulares necesarias del desarrollo (también se conoce como reprogramación epigenética). Durante este desarrollo celular de los mamíferos, los patrones de metilación del ADN deben establecerse, mantenerse y eliminarse. Se sabe que el proceso de metilación del ADN en células somáticas normales en vertebrados está

controlado enzimáticamente por las metiltransferasas (DNMTs), las cuales se ilustran de manera general en la figura 15 (Guardiola, et al., 2015).

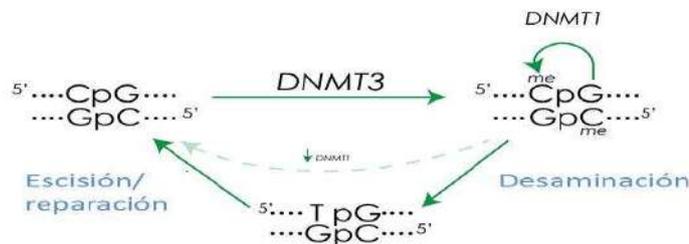


Figura 15. Proceso de metilación y desmetilación del ADN catalizado por las metiltransferasas. Modificado de autor (Handy, et al., 2012).

En los genomas de los individuos, las DNMT son las únicas enzimas que han demostrado mediar en la transferencia de un grupo metilo de S-adenosilmetionina (SAM) a citosina. Las DNMTs son esenciales para el establecimiento de patrones de metilación de citosina, así como para su mantenimiento a lo largo de la replicación celular. Sin la DNMT, la maquinaria de replicación en sí produciría cadenas hijas no metiladas y, con el tiempo, daría lugar a la desmetilación pasiva. Al menos tres DNMT's están implicados en la metilación del ADN. Las DNMT's se dividen en dos categorías: las DNMT's de novo (DNMT3A y DNMT3B) metilan el ADN no metilado, mientras que las DNMT's de mantenimiento (DNMT1) metilan el ADN hemimetilado o asociado a la replicación del ADN, de manera que se transmitan los mismos patrones a las células hijas (Biswas y Rao, 2017).

DNMT1 es principalmente una DNMT de mantenimiento que preserva los patrones de metilación durante la división celular. Se localiza en los focos de replicación del ADN durante la fase S. También hay pruebas de que DNMT1 de novo tiene actividad en las células de cáncer humano y en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Cuando hay daños SSB o DSB, los sitios de reparación pueden reclutar a las DNMT1 que metilan CpG adyacentes a los nucleótidos reparados (Atdbio, 2016; Denis, et al., 2011; Lee y Pausova, 2013).

Se ha identificado otra enzima, DNMT3L, que es deficiente en el dominio catalítico conservado comúnmente asociado con la metiltransferasa de ADN. Aunque se acepta que la ADN metiltransferasa es específica en sus funciones y no se superponen, la evidencia reciente sugiere el papel superpuesto de las metiltransferasas de novo con la metiltransferasa de mantenimiento (Biswas y Rao, 2017).

Dentro de este proceso para establecer y mantener al ADN metilado encontramos distintos grados de metilación, como la hidroximetilación y la desmetilación. La desmetilación es un proceso no tan bien estudiado, que puede tener lugar de forma pasiva durante la replicación del ADN o de forma activa, eliminando grupos metilo durante la fertilización del ovulo; y la hidroximetilación es un paso intermedio de la desmetilación activa del ADN, en donde hay una oxidación de la metilación mediada gracias a la familia de enzimas Ten-Eleven-Translocation (TET) que también ocurre en la posición 5 de las citosinas. Los niveles de hidroximetilación se han correlacionado con genes activos transcripcionalmente, al contrario de lo que mayoritariamente ocurre con la metilación (Guardiola, et al., 2015; Kumar, et al., 2018).

Se ha llegado a la conclusión de que la hipermetilación de secuencias promotoras conlleva el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumor y genes involucrados en el control del ciclo celular, la reparación de ADN y la apoptosis. La metilación de las CGIs en promotores es un mecanismo que afecta a la expresión de los genes de reparación del ADN, haciendo de la metilación uno de los mecanismos genéticos más comúnmente relacionados con el cáncer (Kumar, et al., 2018).

2.6 Reparación del ADN

El ADN se daña alrededor de 20,000 veces al día por factores como el humo del cigarro; si no se repara de manera correcta, puede conducir a un proceso canceroso (Sanner y Grimsrud, 2015).

La reparación del ADN está muy relacionada con la replicación puesto que en la mayor parte de los procesos de reparación se da algo de replicación y con la recombinación, puesto que la recombinación es una de las vías de reparación. Los mecanismos de reparación pueden clasificarse como:

- a) Reparación directa o "in situ": Es aquella en la que se revierte la lesión.
- b) Reparación de desapareamiento de bases (Mismatch Repair) ó reparación de parches muy largos (VLP): Los errores que comete la ADN polimerasa dan lugar a desapareamientos de bases, así si a una G por error se le enfrenta una A, aunque son bases normales, no lo es su apareamiento, (mismatch: bases desapareadas). En condiciones normales la actividad exonucleasa asociada a la polimerasa evita los desapareamientos, pero si no lo hace hay que eliminarlo antes de que la banda se replique, ya que, si no, la mutación quedaría fijada (Ijsselsteijn, et al., 2020).
- c) Reparación inducida: Respuesta SOS y/o reparación inducida en células eucarióticas, ante una cantidad masiva de daños en el ADN, se disparan, como respuesta, mecanismos de emergencia que se caracterizan por tener niveles superiores de proteínas implicadas en reparación y recombinación (Weeden y Asselin, 2018).
- d) Reparación por escisión: Son aquellos mecanismos de reparación en los que se elimina la zona en la que se encuentra la lesión. Hay dos tipos de mecanismos de reparación por escisión: Reparación por escisión de nucleótidos NER (Nucleotide Excision Repair) ó reparación de parches cortos (SP) y reparación por escisión de bases BER (Base Excision Repair) ó reparación de parches muy cortos (VSP) (Weeden y Asselin, 2018).

En general en los mamíferos este último mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) implica 25 genes que procesan bases alteradas, pérdidas de bases y otros daños en su mayoría causados por radicales libres. En general, las lesiones en el ADN causadas por agentes endógenos son reparadas por esta ruta; este proceso de reparación se inicia cuando una clase específica de enzima reparadora

de ADN, una ADN glicosilasa reconoce una base que ha sido alterada químicamente o que es inapropiada. La especificidad de sustrato de cada una de las glicosilasas humanas actúa como indicador del daño causado (Kumar, et al., 2018).

Este proceso de reparación es una desmetilación que requiere de los mecanismos de las DNMT's para la reparación del ADN, en donde podemos tener una desaminación enzimática o una desaminación espontánea (Kumar, et al., 2018; Subhankar y Rao, 2017).

La desaminación enzimática de la 5mC dirige a la formación de timina y el posterior desajuste de los pares de bases T: G. Los mecanismos de reparación de la escisión de la base posteriormente eliminan la timina y restauran el emparejamiento de la base C: G durante la reprogramación epigenética. En la eliminación que se produce de forma predecible en la reprogramación celular, durante la gametogénesis, después de la fertilización en la fase de cigoto, o para preservar la pluripotencia inducida hay una glicosilasa importante de por medio (Kumar, et al., 2018; Subhankar y Rao, 2017).

La desaminación espontánea de 5mC también requiere mecanismos de reparación de la escisión de base para reparar la falta de concordancia entre pares de bases. Este proceso es altamente ineficiente en la mayoría de las células diferenciadas, sin embargo, como la desaminación de 5mC es espontánea, típicamente resulta en un corte total de las secuencias de dinucleótidos CpG (Kumar, et al., 2018; Subhankar y Rao, 2017).

Hasta hace algunos años, la metilación de CpG se consideraba de larga duración y difícil de eliminar después de la diferenciación, por la inactivación o ausencia de DNMT, por la desaminación espontánea y por la falta de reparación en los ajustes de las bases. Se cree que las marcas de metilación del ADN se perdieron "pasivamente" por falta de mantenimiento de la metilación del ADN durante la replicación, dando como resultado una pérdida progresiva de metilación en cada división celular (Kumar, et al., 2018; Subhankar y Rao, 2017).

Con el reciente descubrimiento de que las citosinas pueden hidroximetilarse a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), se han podido establecer dos procesos para la desmetilación del ADN, la desmetilación pasiva y la activa (ver figura 16).

- La desmetilación pasiva puede ocurrir por:
 - a) Una reducción en la actividad, un reclutamiento fallido en el ADN o la ausencia de DNMTs durante las divisiones celulares.
 - b) Las enzimas DNMT ya no reconocen 5hmC, 5fC y 5caC, esto también pueden inducir la desmetilación pasiva del ADN.
- Mientras que la desmetilación activa utiliza las enzimas de la familia de la translocación diez-once (TET), la familia AID (Activación inducida por citidina desaminasa) y una familia de glicosilasas de reparación de escisión (BER); como se observa en la figura 14 el proceso de como interactúan es el siguiente:
 - 1) 5mC es hidroxilada por TET para formar 5hmC.
 - 2) Dirigiéndose a los locus hidroximetilados AID desamina 5mC o 5hmC para formar 5-metiluracilo (5mU) o 5-hidroximetiluracilo (5hmU).
 - 3) Las glicosilasas de la familia BER, Timina-ADN Glicosilasa (TDG) y uracil-ADN glucosilasa monofuncional 1 selectiva (UDG) codificada por el gen SMUG1 sustituyen a estos intermedios (5hmU), culminando en el reemplazo de citosina no metilada por timina (C>T) y desmetilación final del ADN (Ciccarone, et. al, 2018).

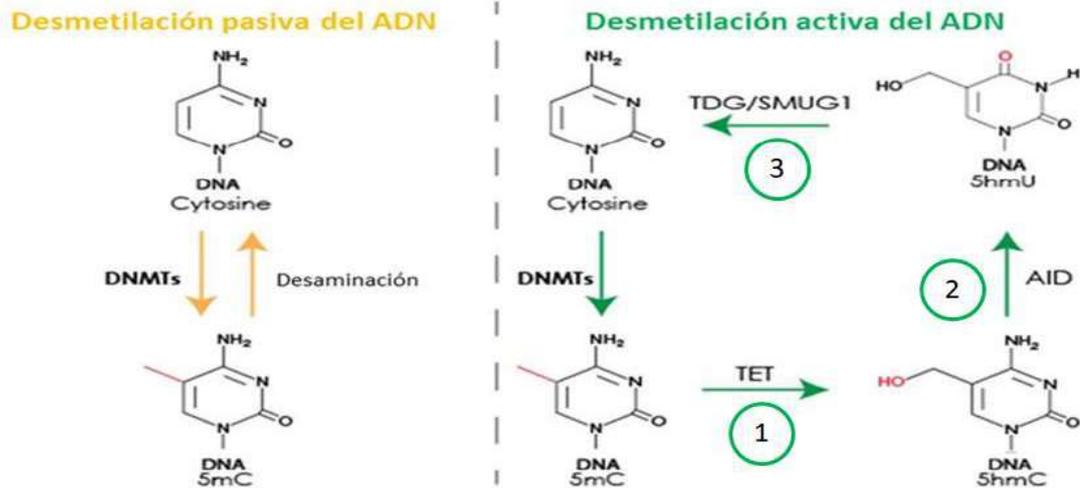


Figura 16. Mecanismo potencial de desmetilación del ADN activo y pasivo. Modificado de autor (Ciccarone, et. al, 2018).

El proceso de estas alteraciones que transforman células normales a células malignas es el objetivo de las investigaciones sobre el cáncer; en los últimos años, los análisis del genoma a gran escala han revelado en todo el espectro de tipos de cáncer humano muchas firmas mutacionales, que son procesos de mutación que ocurren en el ADN de las células que siguen un patrón característico o fijo (Ciccarone, et. al, 2018).

2.7 Aberraciones en genes relacionados con fumadores

El conjunto actual de firmas mutacionales se basa en un análisis de 10,952 exones y 1,048 genomas enteros a través de 40 tipos distintos de cáncer humano. Estos análisis se basan en datos que fueron generados por el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), el International Cancer Genome Consortium (ICGC), y un gran conjunto de mutaciones somáticas publicados en revistas de prestigio. Los adenocarcinomas pulmonares de los fumadores presentan más aberraciones de número de copias que los de los no fumadores, se han estimado y comparado las contribuciones de cada firma en cada cáncer, y los números de mutaciones atribuibles a cada firma en fumadores y no fumadores. Veintiuna de esas llamadas

firmas mutacionales pudieron ser distinguidas en el conjunto completo de genomas de cáncer; la mayoría de los genomas individuales contenían más de una firma, con muchos grupos diferentes de firmas que ocurrían al mismo tiempo. En la figura 17 se muestra un panel de 25 genomas de cáncer de fumadores y no fumadores en cáncer de pulmón, cada barra esta coloreada proporcionalmente al número de mutaciones por megabase atribuido a las firmas mutacionales, se puede observar que la firma o signature 4 es la más común en fumadores (Alexandrov, et al., 2016; Biswas y Rao, 2017).

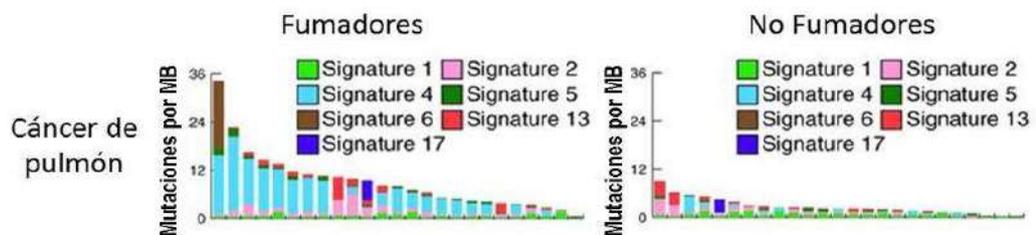


Figura 17. Comparativo de firmas mutagénicas en cáncer de pulmón de fumadores y no fumadores. Modificado de autor (Alexandrov, et al., 2016).

Dentro de las firmas mutacionales encontramos distintos tipos de firmas, por ejemplo, las firmas debidas a sustitución de bases o las firmas debidas a reordenamientos, las cuales están interrelacionadas. La firma o signature 4, es una firma debida a sustitución de base, se ha encontrado en todos los tipos de cáncer de pulmón mostrando la mutación de la sustitución de una citosina por una adenina (C> A) como se puede ver en la figura 18, compatible con la noción de que el daño a la guanina se repara mediante la reparación de la escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción; y es asociado al tabaquismo ya que es encontrada en los tejidos de cáncer de pulmón de los fumadores a diferencia de los no fumadores, lo cual la coloca como una firma que ocurre por exposición directa al tabaco (Alexandrov, et al., 2016).

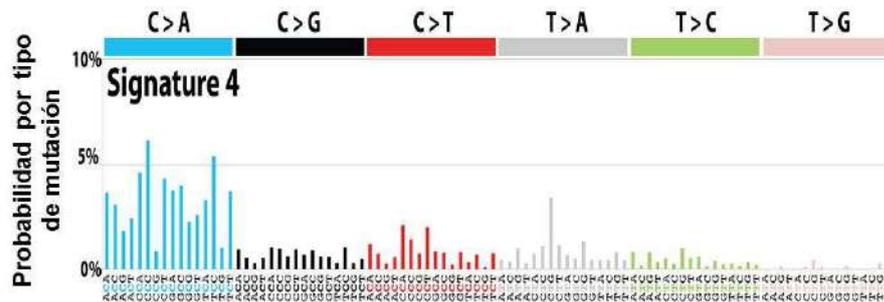


Figura 18. Porcentaje de las principales mutaciones en la firma o signature 4.
Modificado de autor (Alexandrov, et al., 2016).

Mientras por la parte epigenética, la alteración en el patrón de metilación del ADN está muy relacionada con el inicio y la progresión del cáncer y también fueron las primeras alteraciones epigenéticas identificadas. Se observan dos patrones aparentemente opuestos de metilación del ADN en las células cancerosas, que incluyen el aumento de la metilación de las islas CpG y una disminución general en el patrón global de metilación del ADN (Biswas y Rao, 2017).

Numerosos estudios han identificado sitios CpG asociados o causalmente relacionados con el tabaquismo. Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) de supervivencia en cáncer de pulmón, insuficiencia cardíaca y etapas de tabaquismo (iniciación, persistencia, tolerancia y abandono) han identificado variantes genéticas asociadas con la mortalidad. Se han evaluado las asociaciones de todo el epigenoma entre la metilación del ADN (ADNm) y la mortalidad en el ADN de leucocitos de sangre periférica (Morrow, et al., 2020; Nwanaji y Colicino, 2020).

- En un estudio longitudinal de nueve años de 499 sujetos en Italia, que incluyó fumadores actuales y exfumadores (56.7% no tenía antecedentes familiares de tabaquismo), se encontró que 88 marcas de metilación estaban asociadas con la mortalidad en un análisis de riesgo proporcional de Cox (Morrow, et al., 2020).
- Un estudio de 9,949 adultos mayores (de 50 a 75 años) en Alemania produjo una puntuación de riesgo de mortalidad basada en 10 sitios CpG

seleccionados de los 58 sitios replicados asociados con la mortalidad en un análisis de regresión de Cox (Morrow, et al., 2020).

- Se encontró que los niveles de metilación del ADN en 2,806 sitios se asociaron significativamente con la supervivencia mediante la regresión de Cox en una cohorte de gemelos daneses mayores (de 55 a 90 años) seguidos por hasta 20 años (Morrow, et al., 2020).
- En un estudio del genoma de la metilación del ADN en 111 nonagenarios, se identificaron sitios asociados con la mortalidad a los cuatro años de seguimiento (Morrow, et al., 2020).
- Dentro de una población escocesa de 1,425 individuos, un estudio reciente identificó 2,552 sitios CpG con niveles de ADNm asociados con mortalidad por todas las causas mediante la regresión de Cox (Morrow, et al., 2020).
- También se han identificado asociaciones entre el ADNm y la mortalidad en un estudio dirigido del gen AHRR y en el esputo (Morrow, et al., 2020).
- Además, estudios previos han demostrado el impacto del tabaquismo sobre el ADNm en la sangre periférica, incluidos los efectos de la intensidad y el tiempo de fumar desde que se dejó de fumar (Morrow, et al., 2020).

La tecnología más utilizada para el análisis de metilación del ADN en humanos son los microarrays de alta densidad para medir los niveles individuales de metilación de CpG en aproximadamente un millón de sitios de CpG para cada muestra de ADN, varias plataformas se han utilizado en estudios de asociación de todo el epigenoma (EWAS) en los que se analizan los niveles de metilación del ADN en cada sitio de CpG individualmente. EWAS se ha empleado cada vez más para descubrir mecanismos biológicos que subyacen a los estímulos ambientales extrínsecos y los resultados adversos para la salud. Debido a que la metilación del ADN es sensible a factores externos y puede mostrar cambios en múltiples sitios de CpG en respuesta a tóxicos ambientales, se pueden combinar múltiples cambios para construir un estimador compuesto de exposiciones ambientales y factores de estilo de vida. Estos estimadores compuestos son únicos porque van más allá de las simples asociaciones de loci. Una herramienta reciente, EpiSmokEr, fue

desarrollada por Bollepalli, et al. en el 2018 como una herramienta de predicción del estado del tabaquismo desde los datos de la metilación de ADN. Utilizando un conjunto de datos de metilación de ADN de células de sangre periférica de 474 adultos finlandeses, datos de cantidad de cigarrillos que ellos mismos reportaron, y la exposición ambiental, los autores emplearon un algoritmo de aprendizaje automático (regresión LASSO multinomial) para construir una herramienta de clasificación a partir de 121 sitios CpG correspondientes a 92 genes. El análisis de ontología génica de estos genes demostró cierto enriquecimiento para los procesos generales, incluida la unión al ADN y el desarrollo esquelético (Bollepalli, et al. 2019; Morrow, et al., 2020; Nwanaji y Colicino, 2020).

2.8 La metilación del ADN como biomarcador de exposición al tabaquismo

Los cambios en la metilación del ADN son críticamente relevantes para la salud humana dada la capacidad conocida de la metilación del ADN para alterar la expresión génica, lo que afecta la expresión fenotípica, incluida la posible manifestación y progresión de enfermedades. Por estas razones, se han explorado como precursores de enfermedades y mortalidad por todas las causas. Estas alteraciones, una vez establecidas, pueden persistir en ausencia de los factores ambientales que los indujeron, como el humo del cigarro. De hecho, la metilación del ADN, que tiene un mecanismo claro para la herencia posmitótica, tiene el potencial de retener la firma de exposiciones después de muchos años y, debido a su estabilidad interindividual durante un largo período de tiempo, ofrece un mecanismo biológico inherente para que las células recuerden las alteraciones asociadas con las exposiciones ambientales; varios estudios han demostrado que esos cambios relacionados con el humo en los perfiles de metilación del ADN persisten en la descendencia expuesta durante décadas después de la exposición prenatal (Nwanaji y Colicino, 2020).

Los fumadores ocasionales tienen diferentes perfiles de metilación del ADN que nunca fumadores e incluso fumadores habituales / actuales. Además, dejar de

fumar puede resultar en la restauración parcial de los niveles de metilación previos al tabaquismo. Por lo tanto, los cambios de metilación del ADN relacionados con la exposición pueden ser persistentes (es decir, cambios estables) o reversibles (es decir, volver al estado anterior) una vez que la exposición ya no está presente. Esta combinación de cambios persistentes y reversibles tiene un valor importante para el desarrollo de biomarcadores. Hasta ahora, los biomarcadores desarrollados han identificado combinaciones de CpG que reflejan los niveles de exposición y permiten cierta reconstrucción del tiempo de exposición. Pueden proporcionar más información sobre el mecanismo biológico y la función asociada a la salud humana que los biomarcadores basados en compuestos de exposición (Nwanaji y Colicino, 2020).

3. HIPÓTESIS

El porcentaje de metilación del ADN genómico en linfocitos de sangre periférica se verá alterado por el consumo de tabaco de manera estadísticamente significativa en los grupos de estudio: pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón, fumador activo, fumador pasivo y exfumador al compararlos contra el grupo de no fumador.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo

Determinar el porcentaje de metilación en el ADN genómico en linfocitos de sangre periférica.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de metilación global del ADN genómico en linfocitos de sangre periférica, por efecto del humo del tabaco para asociar de manera cuantitativa el porcentaje de metilación del ADN y los grupos de estudio (fumador activo, exfumador, fumador pasivo, no fumador y pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón) y determinar si existe alguna diferencia significativa entre ellos.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Definición del universo/Población: Estudiantes de todos los semestres de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro y pacientes con cáncer de pulmón del Hospital del ISSSTE de Querétaro.

5.2 Tamaño de muestra: La técnica utilizada fue un muestreo por conveniencia, la cual permitió seleccionar aquellos casos accesibles que aceptaron ser incluidos. Esto, fundamentado en la conveniente accesibilidad y proximidad de los sujetos para este proyecto (Otzen y Manterola, 2017).

5.3 Descripción de las condiciones experimentales:

- Definición de las unidades de observación: Porcentaje de metilación en ADN global en linfocitos de sangre periférica en alumnos de la Facultad de Química de la UAQ. y pacientes con cáncer de pulmón del Hospital del ISSSTE de Querétaro.
- Definición del grupo control: El grupo de control fue el grupo de no fumadores, estas fueron las muestras contra las que se comparó al resto.
- Criterios de inclusión: Alumnos de la Facultad de Química de la UAQ entre los 18 y 24 años, con cualquier estilo de vida y personas con diagnóstico de cáncer de pulmón del Hospital del ISSSTE de Querétaro.
- Criterios de exclusión: Cualquier alumno fuera del rango de edad de 18 a 24 años, esto solo con el fin de acotar el tiempo promedio de años que tienen fumando. Ningún otro criterio, como sus datos personales, historia médica de familiares directos (padres, hermanos y abuelos), hábitos de alimentación, actividad física y tabaquismo fueron considerados como criterios de exclusión; estos datos fueron tomados en cuenta para la discusión y conclusión de la investigación si es que alguna relación o asociación fuera encontrada durante el análisis de resultados. Cualquier paciente del Hospital

del ISSSTE de Querétaro que no contara con diagnóstico de cáncer de pulmón.

- Criterios de eliminación: Cualquier alumno que estuviera tomando medicamentos que podrían afectar potencialmente el contenido de uracilo de ADN: antipurinas (por ejemplo, azatioprina), fármacos de quimioterapia o antifolatos (por ejemplo, metotrexato) y antibióticos sulfonamida. Estos criterios no se tomaron en cuenta para los pacientes del Hospital del ISSSTE de Querétaro con diagnóstico de cáncer de pulmón, ya que el proyecto contempla la investigación del porcentaje de metilación del ADN como biomarcador temprano del cáncer del pulmón, y era de vital importancia la referencia de pacientes ya diagnosticados.
- Definición de variables y unidades de medida: La clasificación fue en grupos con base en una variable cuantitativa discontinua; las muestras fueron divididas en cinco grupos, de acuerdo con la caracterización hecha por la Secretaría de Salud respecto al consumo de tabaco, y a la información obtenida de un cuestionario llenado previamente por cada estudiante que participó en este estudio, donde se estableció la cantidad de cigarrillos fumados o no en el último año.
 - a) Fumador activo: Quienes hubieran fumado al menos un cigarro al día en los últimos 12 meses antes de la toma de muestra.
 - b) Exfumador: Quienes hubieran fumado al menos un cigarro al día, pero se han detenido al menos 12 meses antes de la toma de muestra.
 - c) Fumador pasivo: Quienes hallan referido nunca haber fumado en la vida, pero que convivían a diario con al menos una persona que fuma cigarrillos en su casa, en la escuela o en su trabajo.
 - d) No fumadores: Quienes reporten nunca haber fumado
 - e) Pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón

5.4 Selección de las fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información.

Se hizo una encuesta a cada participante, previa a la extracción de muestra, las preguntas destinadas, se extrajeron del cuestionario de la encuesta mundial de tabaquismo en adultos, con el fin de obtener los datos sobre la cantidad de cigarrillos fumados, tiempo que tiene fumando y edad.

5.4.1 Metodología

- Recursos materiales:
 - a) Sangre con EDTA.
 - b) Kit de extracción de ADN genómico (kit QIAamp® DSP ADN Blood Mini).
 - c) Kit MethylFlash Methylated ADN 5-mC Quantification (Colorimetric) (Epigentek).
 - d) Cámara de electroforesis.

5.4.2 Procedimiento

- Obtención de muestras

Extracción de sangre periférica con holders y agujas negras y verdes por medio de punción venosa en tubos con EDTA, este fue 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, resultó difícil extraer la muestra de sangre, por lo que tal vez fue preciso puncionar dos veces para extraer muestra de sangre suficiente. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su uso para asegurar su preservación y detener la acción de las nucleasas.

- Extracción, purificación y cuantificación de ADN

El kit utilizado usa la tecnología de membrana de gel de sílice. El ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato, estos forman puentes de hidrogeno

creando una capa hidratante al igual que el gel de sílice; gracias a estas estructuras, no se pueden establecer interacciones entre ellos debido a los puentes de hidrógeno. Las sales caotrópicas atraen las moléculas de agua y eliminan la capa hidratante que recubre las diferentes biomoléculas; esto permite que dichas moléculas (membrana de sílice y ADN) interactúen por medio de diferentes mecanismos. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílice de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílice mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana (Katevatis, et al., 2017).

Se usan tampones que contienen detergentes para romper la membrana celular y proteasas para digerir las proteínas celulares. La proteinasa K, es la proteasa más usada por ser la de más amplio espectro (degrada todas las proteínas), se conoce bien su funcionamiento y está muy estudiada y se suele usar con tampones que contienen SDS y EDTA (Katevatis, et al., 2017).

Cada procedimiento QIAamp DSP ADN Blood Mini comprende cuatro etapas (ver figura 19):

- a) Lisis de las células presentes en la muestra de sangre.
- b) Unión del ADN genómico del lisado celular a la membrana de una columna de centrifugación QIAamp Mini.
- c) Lavado de la membrana.
- d) Elución del ADN genómico de la membrana (Qiagen, 2012).

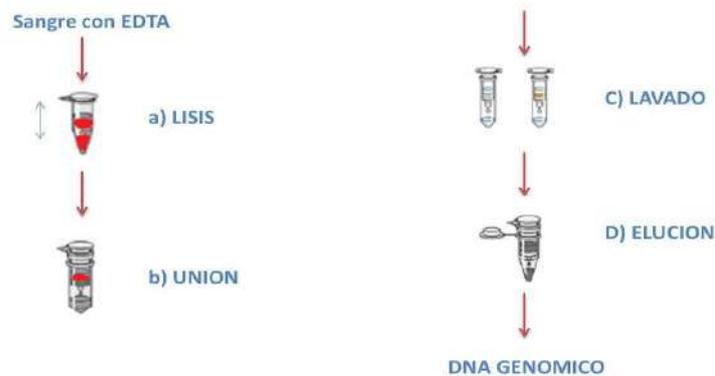


Figura 19. Pasos generales de la extracción de ADN (Qiagen, 2012).

Las diferentes células y tejidos tienen firmas distintas de metilación del ADN. El uso de ADN de sangre periférica en el presente estudio es razonable por dos razones. Primero, la sangre periférica es un portador importante para muchos xenobióticos absorbidos por el cuerpo humano; ya que las células de sangre periférica tienen contacto directo con las formas internas de xenobióticos y reaccionan a ellas. Segundo, las muestras de sangre son las más convenientes para recolectar en estudios a gran escala, y el uso de células sanguíneas permite comparar nuestros resultados con los de otros estudios (Zhu, et al., 2016).

- Integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN según su tamaño.

Todas las moléculas de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa. Debido a esto, la electroforesis en gel separa los fragmentos de ADN únicamente por su tamaño. El voltaje típico para correr un gel de agarosa para ADN estaría en el intervalo de 80 – 120 V. Un voltaje más alto hará que el gel corra más rápido, pero también puede derretir el gel si corre por un largo periodo de tiempo.

Después de un rato que ha corrido el gel, los fragmentos más cortos de ADN estarán más cerca del extremo positivo del gel y los más largos se mantendrán cerca de los

pozos. Los fragmentos de ADN muy pequeños podrían correr hasta salirse del gel si lo dejáramos corriendo por demasiado tiempo.

Cada banda contiene un gran número de fragmentos de ADN del mismo tamaño que han viajado juntos a la misma posición. Un fragmento único de ADN (o incluso un pequeño grupo de fragmentos de ADN) no sería visible por sí mismo en un gel (Cornejo, et al., 2014).

El procedimiento fue el siguiente:

1. Preparación de buffer TAE 10X (TRIS, ácido acético, EDTA). Se pesaron 48.4 g de base Tris, 11.4 ml de ácido acético glacial (17.4 M), 3.7 g de EDTA. Se disolvió el Tris, ácido acético glacial y EDTA en 800 ml de agua desionizada, se aforó el tampón a 1 L. No fue necesario esterilizar la solución. Se guardó en temperatura ambiente. Se pusieron 10 ml de preparación y se aforó a 1 L con agua desionizada para obtener el Buffer TAE 1.0X.
2. Se pesaron 2 g de agarosa y se disolvieron en 200 ml de Buffer TAE 1.0 X (TRIS, ácido acético, EDTA). Posteriormente se calentó en el microondas por 20 segundos para disolver la agarosa.
3. Se agregaron 2 µl de Bromuro de Etidio (1µl por cada 100 ml de gel).
4. Se transfirió al molde y se colocó el peine para formar los pozos.
5. Se dejó solidificar a temperatura ambiente (Bravo, et al., 2012).
6. Se colocó el molde dentro de la cámara de electroforesis y se llenó la cámara con buffer TAE.
7. Se cargó la muestra 3:7 con buffer de carga.

Las condiciones para la separación del ADN genómico por electroforesis en gel de agarosa fueron las siguientes:

- Voltaje constante de 120 volts.
- Amperaje máximo de 400 amperes.
- Tiempo en la fuente de poder para la integridad del ADN: se dejó correr durante 20 minutos.

La intensidad está relacionada con la cantidad de ácidos nucleicos, la longitud del ADN genómico es de aproximadamente 3200 millones de pb en 23 pares de cromosomas.

Una sola “banda” que representa ADN íntegro, que no se degradó y por su tamaño determinado con los marcadores de pesos moleculares nos indica que se obtuvieron ADNs de alto peso molecular.

- Si el ADN estaba íntegro, se observó una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN, como se muestra en la figura 20.
- Si estaba fragmentado, se observó una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (Green y Sambrook, 2019).

En la figura 20 se muestra el corrimiento electroforético de 44 muestras tomadas al azar del proyecto (22 en cada imagen) en donde se muestra el ADN íntegro-intacto. El ADN genómico se desplazó en un gel de agarosa al 1%, y por el tamaño de este (20-25 Kb - 25.000 pares de base) la migración es muy cercana al pozo de siembra (Green y Sambrook, 2019).

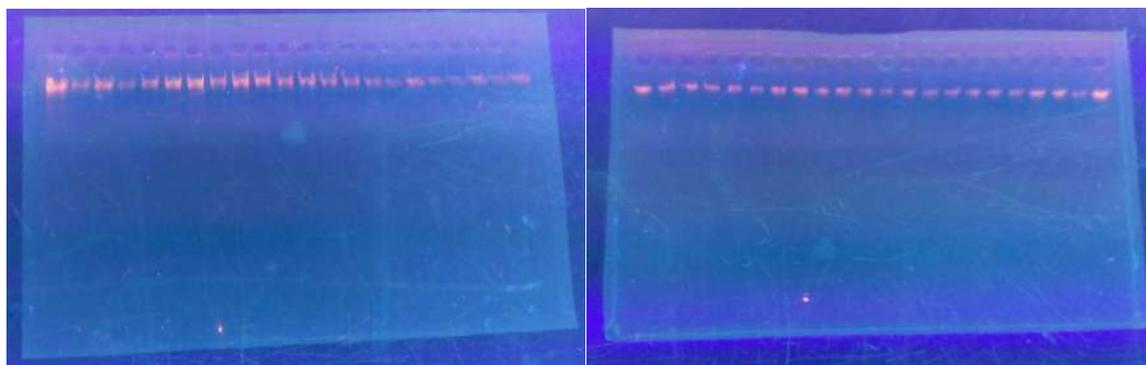


Figura 20. Corrimiento electroforético de 44 muestras extraídas.

- Concentración y pureza de las muestras mediante espectrofotometría
Mediante espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada (García, et al., 2020).

De este modo la concentración de la muestra de ADN se calculó teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm, ya que los nucleótidos poseen máximos de absorción alrededor de 260 nm (por ejemplo, dATP: 259 nm; dCTP: 272 nm; dTTP: 247 nm). Medidas tomadas a una A260 debían encontrarse entre 0.1 y 1.0. Una absorbancia de una unidad a 260 nm corresponde 50 µg de ADN por ml (García, et al., 2020).

Mientras que la relación de absorbancias A260/280 se utilizó para evaluar la pureza de las muestras, tomando como referencia en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de referencia para evaluar la pureza de ADN
(García, et al., 2020).

Radio	Valor	Pureza
260/280	1.8 - 2	ADN de pureza óptima
	1.6 – 1.8	ADN pureza aceptable
	Menor a 1.6	Presencia de compuestos aromáticos y proteínas
	Mayor a 2.1	Contaminación con ARN
260/230	Menor a 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos y fenoles

Se diluyó 1 µl de muestra en 1 ml de agua destilada esterilizada y se midió en celda de cuarzo cada una de las muestras (García, et al., 2020).

Para determinar la concentración se utilizó la siguiente relación:

$$\text{ADN } \mu\text{g/mL} = \text{absorbancia 260 nm} \times \text{Factor de dilución} \times 50$$

Donde 50 µg/mL, es el factor para el cálculo de ADN de doble cadena (Green y Sambrook, 2018).

Algunos resultados de concentración y pureza de las muestras del proyecto se muestran en la tabla 3 (Grupo: NF- No fumador, P- Pasivo, EF-Exfumador, F- Fumador), siguiendo la metodología arriba descrita y con resultados satisfactorios en ambos requerimientos.

Tabla 3. Concentración y pureza de ADN extraído

Grupo	#	Abs 230	Abs 260	Abs 280	Abs 320	Concentración inicial ng/ul (ug/ml)	260/280 ratio	260/230 ratio
	Blank	0.0677	0.0457	0.0414	0.0383	7.40	2.387	0.2517
NF	317	0.0848	0.0570	0.0489	0.0404	16.60	1.953	0.3739
P	108	0.0860	0.0542	0.0470	0.0396	14.60	1.973	0.3147
EF	501	0.0856	0.0598	0.0499	0.0398	20.00	1.980	0.4367
F	120	0.0927	0.0588	0.0512	0.0423	16.50	1.854	0.3274

- Cuantificación de metilación

El Kit de Cuantificación de MethylFlash Methylated ADN es un conjunto completo de tampones y reactivos optimizados para cuantificar colorimétricamente la metilación global del ADN desnaturalizado monocatenario, midiendo específicamente niveles de 5-mC en un formato basado en microplacas tipo ELISA indirecta, con la ayuda de un anticuerpo monoclonal anti-5-metilcitosina. La tecnología cuantifica directamente la metilación real del ADN global, eliminando los pasos de secado y bloqueo de la placa. Para llevar a cabo una correcta cuantificación mediante colorimetría del porcentaje de ADN genómico se requieren un mínimo de 100 ng de ADN en cada muestra.

En este ensayo como se muestra en la figura 22, se hicieron los siguientes pasos:

1. El ADN extraído se puso en cada uno de los pocillos de la placa tipo ELISA, haciendo tres réplicas de cada una de las muestras.
2. Se procedió a efectuar varios lavados y capturar el ADN metilado con un anticuerpo.
3. Se hizo la detección con el anticuerpo secundario.
4. Para aumentar la señal de ADN metilado se utilizó la solución buffer.

5. Se añadió la solución reveladora de color para medir la absorbancia.
6. La medición de la cuantificación de la colorimetría se realizó de acuerdo a la intensidad de la densidad óptica medida en la placa a 450 nm.
7. En el estudio se incluyeron los correspondientes controles negativos y positivos, donde el control positivo contiene un 50 % de citosinas metiladas, 5mC.
8. Los resultados fueron expresados en porcentaje de las deoxycitosinas metiladas del total de ADN, para cada una de las muestras utilizando la siguiente fórmula mostrada en la figura 21:

$$5\text{-mC (ng)} = \frac{\text{Sample OD} - \text{ME3 OD}}{\text{Slope} \times 2^*}$$

$$5\text{-mC \%} = \frac{5\text{-mC Amount (ng)}}{S} \times 100\%$$

S: Cantidad en ng de ADN de la muestra Slope: Pendiente curva
 Sample OD: Densidad óptica ME3 OD: Densidad óptica control negativo
 *2 es el factor para normalizar 5-mC del control positivo al 100%, ya que este control contienen el 50% de 5-mC

Figura 21. Fórmula para el cálculo del porcentaje de metilación (Epigentek, 2017)

La cantidad de ADN metilado es proporcional a la intensidad de la densidad óptica (OD) medida o 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) (Epigentek, 2017).

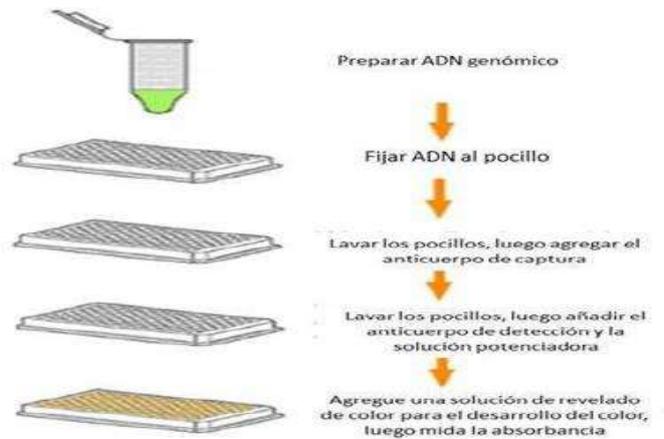


Figura 22. Esquema del procedimiento del kit de metilación. Modificado de autor (Epigentek, 2017).

Para cuantificar la cantidad absoluta de ADN metilado usando un cálculo preciso, se debió generar una curva estándar trazando los valores de OD frente a la cantidad del control positivo en cada punto de concentración. A continuación, se utilizó una hoja de Excel para el análisis, se determinó la pendiente (OD / ng) de la curva estándar utilizando la regresión lineal, y la parte más lineal (al menos cuatro puntos de concentración incluyendo la concentración cero) para el cálculo de la pendiente (Epigentek, 2017).

- Definición de plan de procesamiento y presentación de la información

Los resultados se analizaron mediante la técnica de análisis de varianza (ANOVA), ya que constituye la herramienta básica para el estudio del efecto de uno o más factores sobre la media de una variable continua como se describe a continuación. Esta prueba estadística se empleó para comparar las medias entre los grupos y los posibles efectos de los factores sobre la varianza de una variable (Amat, 2016).

Se calculó la media de cada uno de los grupos (fumador, no fumador, exfumador, pasivo y paciente con cáncer) para a continuación comparar:

1. La varianza de estas medias (varianza explicada por la variable grupo, intervarianza)

2. Frente a la varianza promedio dentro de los grupos (la no explicada por la variable grupo, intravarianza).

Bajo la hipótesis nula (H_0) de que las observaciones de los distintos grupos proceden todas de la misma población (tienen la misma media y varianza), la varianza ponderada entre grupos será la misma que la varianza promedio dentro de los grupos.

Conforme las medias de los grupos estén más alejadas las unas de las otras, la varianza entre medias se incrementará y dejará de ser igual a la varianza promedio dentro de los grupos, ver ejemplo en la figura 23.

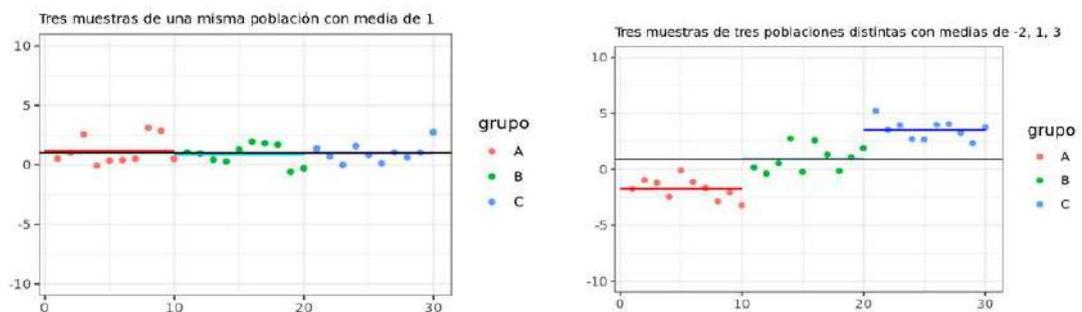


Figura 23. Ejemplos gráficas ANOVA (Amat, 2016).

Las hipótesis contrastadas en un ANOVA de un factor son:

H_0 : No hay diferencias entre las medias de los diferentes grupos: $\mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_k = \mu$

H_0 : Al menos un par de medias son significativamente distintas la una de la otra.

Las observaciones deben ser aleatorias. El tamaño total de la muestra de cada grupo debe de ser $< 10\%$ de la población a la que representa. Los grupos (niveles del factor) deben de ser independientes entre ellos (Amat, 2016).

El ANOVA hace la comparación entre todas las categorías y entre cada una de las categorías para obtener la diferencia estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Datos generales de consumo del tabaquismo en muestras del proyecto

Los datos obtenidos sobre la cantidad de hombres y mujeres, la edad promedio, la cantidad de cigarrillos al día, promedio de años fumando y horas de exposición de los participantes del proyecto se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Datos generales del tabaquismo en muestras del proyecto

Grupo	No de personas	Promedio de edad	Promedio cigarrillos por día	promedio de años fumando	Promedio de horas de exposición
Mujeres	120	19	2.6	2.7	2.6
Hombres	73	19	2.6	5.1	2.8
Pacientes Ca pulmón	4	66.5	NA	NA	NA

La cantidad de cigarrillos por día va de un rango de uno a siete cigarrillos por día, y el rango de horas de exposición es de 0.5 hrs. a 18 hrs. por día.

De acuerdo con el ENCODAT en Querétaro, la edad promedio de inicio de consumo de tabaco diario es de 19 años en las mujeres y los hombres, dato que se verifica en nuestros resultados con los participantes en este proyecto (Reynales, et al., 2017).

Una exposición acumulada a factores de riesgo como el tabaquismo y el envejecimiento, son señalados por la OMS como los principales factores de riesgo para la aparición y desarrollo de determinados tipos de cáncer, como los tumores en órganos respiratorios e intratorácicos; Querétaro reporta una de las tasas de morbilidad hospitalaria más altas (76.06%) en el rango de edad de 65 a 74 años; en este rango de edad encontramos a nuestros participantes en este proyecto diagnosticados con cáncer de pulmón, y solo uno de ellos reportó ser exfumador; por lo cual la edad se puede ver relacionada en este resultado como factor de riesgo para su actual enfermedad (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2019).

6.2 Edades de inicio de consumo del tabaco en hombres y mujeres

Con la referencia de los datos generales del proyecto, se comparó el promedio de la edad de inicio del consumo de ambos sexos con la media nacional, mujeres 21 y hombres 18.8 años, de acuerdo con Reynales y cols. en 2017 en la Encuesta de consumo de drogas, alcohol y tabaco 2016-2017, obteniéndose la gráfica de la figura 24 (Reynales, et al., 2017).

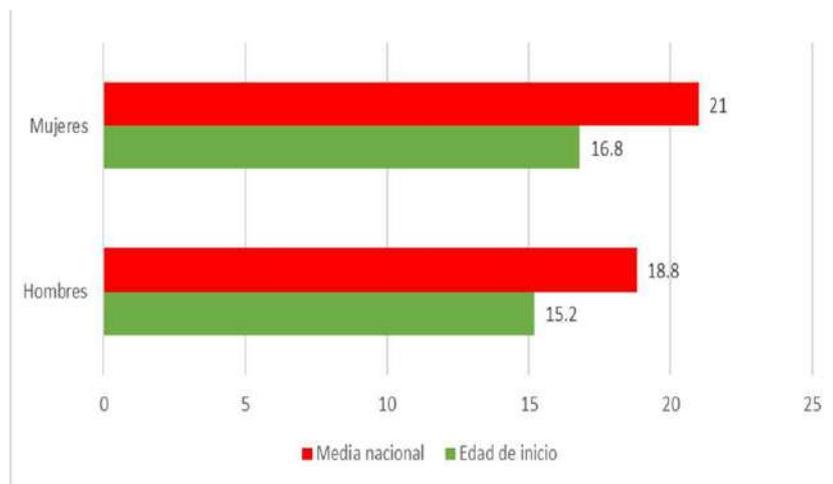


Figura 24. Inicio de consumo en ambos sexos vs media nacional.

Comparando con el promedio de años fumando, es importante destacar que el inicio de este hábito en hombres es alrededor de los 15 años y de 17 en las mujeres, tal cual se refleja también en las estadísticas generales del Estado (Reynales, et al., 2017), y comprobando que en la entidad los jóvenes inician a más temprana edad que a nivel nacional (Mujeres 16.8 y Hombres 15.2).

6.3 Porcentaje de incidencia en los diferentes grupos de estudio

La cantidad de cigarrillos fumados implica un grado alto de exposición entre las personas no fumadoras o pasivas como se muestra en la figura 25, solo un 13% son fumadores, el 29% no fumador, un 24% es considerado exfumador y el porcentaje más alto es el del grupo pasivo con un 34%.

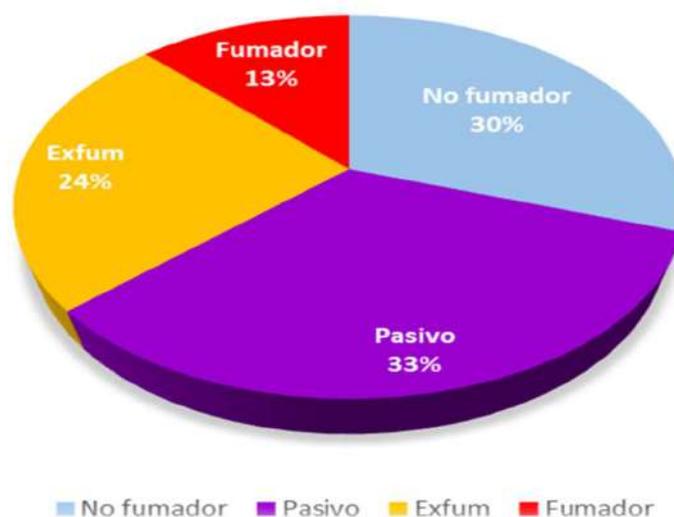


Figura 25. Distribución del tabaquismo en los diferentes grupos de estudio.

Aunque la ley establece la prohibición a fumar en los espacios públicos y/o lugares cerrados en instituciones médicas y centros de enseñanza, aún el estado no es considerado 100% libre de humo de tabaco; esto se observa en la gráfica, donde el grupo de los pasivos es el de mayor porcentaje, exponiéndolos a los daños ocasionados por el humo de tabaco de segunda mano (HTSM) en cualquier lugar no libre de humo de tabaco; y aunque si bien este proyecto no abarca a los grupos más vulnerables como niños, mujeres embarazadas, personas con enfermedades crónicas y personas de la tercera edad; también es necesario resaltar que el riesgo para ellos se puede ver incrementado por la naturaleza de los mismos.

6.4 Distribución del tabaquismo en muestras del proyecto por edad y sexo

Considerando que esta actividad es más dañina en mujeres que en hombres, también se registró la distribución del porcentaje de fumadores por edad entre ambos sexos la cual se muestra en la figura 26, del total de participantes clasificados como fumadores en este proyecto (21 participantes en total), el porcentaje se distribuyó de la siguiente manera en ambos sexos: 48% en mujeres y 52% en hombres.

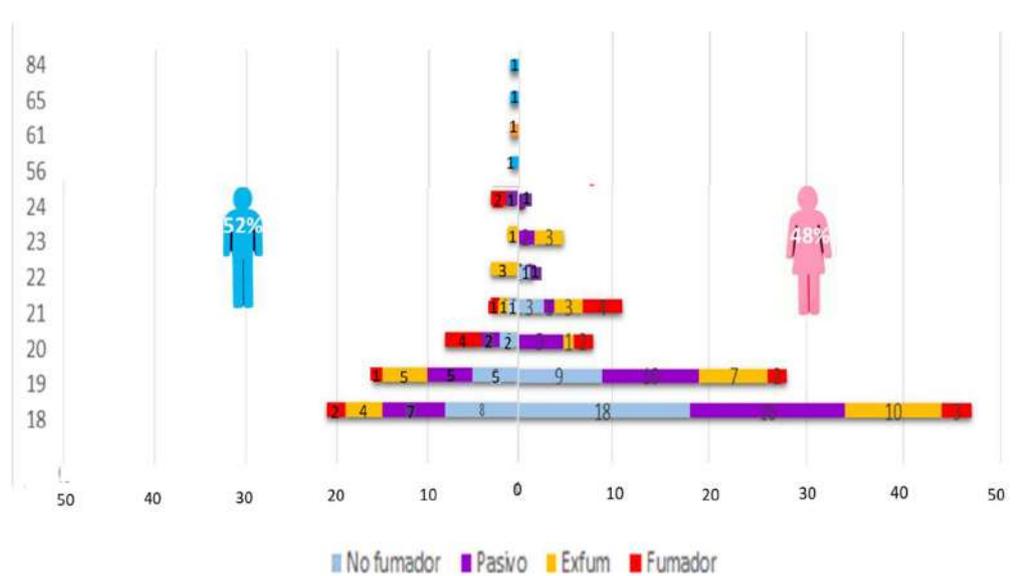


Figura 26. Distribución del tabaquismo por edad y sexo.

En mayo del 2019, la clínica del tabaquismo de la UNAM afirmó que las mujeres y su consumo del tabaco de las niñas entre 12 y 15 años habían duplicado su prevalencia en los últimos años (Reynales, et al., 2017); esto es una preocupación en motivos de la salud, puesto que las sustancias tóxicas tienen un efecto mayor en el aparato respiratorio femenino, ya que su dimensión corporal y por tanto su capacidad pulmonar es menor que en los hombres; por ello aumenta el riesgo de padecer enfermedades como cáncer de pulmón y EPOC.

6.5 HSTM en el hogar

Se obtuvieron datos que pudieran marcar alguna tendencia de costumbre adquirida y/o hábito al tabaquismo por parte de los padres.

Se evaluó el porcentaje de pacientes expuestos al humo de cigarro en sus hogares 29.7% del universo de este proyecto, contra la media nacional que se encuentra por debajo 14.1% como se muestra en la figura 27. No se incluyen pacientes con CA de pulmón

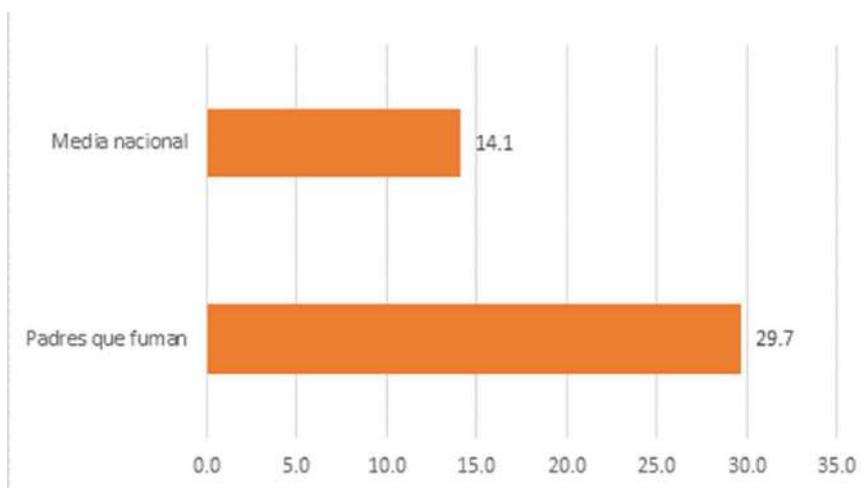


Figura 27. Porcentaje de personas expuestas al humo del cigarro en sus hogares.

Además del HSTM de los lugares públicos, el porcentaje reflejado en este resultado está muy cerca del documentado por el ENCODAT en el estado, que es de un 30.4% (Reynales, et al., 2017), haciendo del HSTM uno de los factores de riesgo más importantes en el daño ocasionado por el tabaquismo.

6.6 Incidencia de cáncer en familiares directos de participantes en el proyecto

Se consideraron los diferentes tipos de cáncer en los familiares más cercanos de cada uno de los pacientes, en la figura 28 se muestran estos datos, teniendo al cáncer de mamá (17%), próstata (14%) y pulmón (13%) como los de más alto porcentaje. El 44% de las personas reportaron por lo menos un familiar con cáncer.

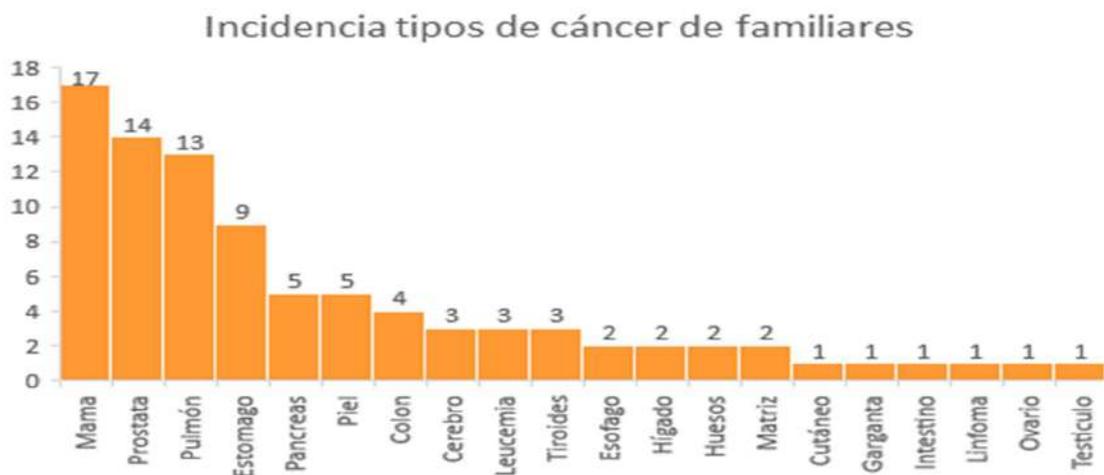


Figura 28. Incidencia tipo de cáncer en familiares directos.

Nueve de cada 10 muertes de cáncer de pulmón se deben al consumo del cigarrillo, dejar de fumar reduce el riesgo de 12 tipos de cáncer entre ellos, el de mamá, el de próstata y el de pulmón, los tres tipos de cáncer más altos presentados en familiares directos (Charvel, et al., 2018; Reynales, et al., 2017).

6.7 Análisis de varianza de la metilación de los diferentes grupos

Los promedios en el porcentaje de metilación global del ADN eran de 0.32% en los no fumadores, 0.36% en los fumadores pasivos, 0.66% en los fumadores, 0.97% en los exfumadores y 1.58% en los pacientes con cáncer de pulmón, lo que están indicados en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de % de metilación y promedio por grupo

Grupo	Folio	% metilación	Género	% promedio de metilación	Varianza
No fumadores	405	0.03	M	0.32	0.1404
	411	0.74	H		
	511	0.18	M		
Pasivos	313	0.45	H	0.36	0.0145
	302	0.28	M		
Fumadores	106	0.71	M	0.66	0.0066
	1603	0.60	M		
Exfumadores	2401	0.99	M	0.97	0.0158
	319	0.91	M		
	2402	1.13	H		
	2403	0.84	M		
Pacientes con cáncer de pulmón	C1	0.95	H	1.58	0.5646
	C2	1.91	H		
	C3	2.49	H		
	C4	0.98	H		

Las diferencias en la metilación del ADN se han asociado con una lista creciente de morbilidades, que van desde trastornos metabólicos y deterioro de la salud relacionado con la edad, hasta afecciones neuropsiquiátricas y del desarrollo (Bartlett, et al., 2019). Estos cambios en la metilación del ADN en las células cancerosas tienen poco efecto directo sobre la expresión génica, pero en cambio afectan la organización del genoma en el núcleo (Madakashira y Sadler, 2017). El enfoque estándar en un estudio de asociación de todo el epigenoma (EWAS), que intenta vincular la metilación del ADN con la enfermedad, implica la recolección de una única bioespecimen de cada participante (típicamente sangre periférica o

saliva) y realizar análisis transversales para comparar los patrones de metilación en casos contra controles sanos emparejados. Si bien las diferencias en la metilación de CpG entre casos y controles pueden estar directamente relacionadas con la enfermedad, estas diferencias entre casos y controles también pueden representar variaciones en la secuencia de ADN, diferencias en el tratamiento de la enfermedad, la edad, diferencias en el comportamiento o el entorno, o diferencias en la composición celular (Bartlett, et al., 2019).

Por otro lado, estudios independientes reportaron diferencias en la metilación del ADN entre hombres y mujeres en varios tejidos, involucrando sitios CpG diseminados en los cromosomas autosómicos. Estas diferencias reflejan la diversidad en los perfiles transcriptómicos y proteómicos entre los dos sexos. Según el reloj de Horvath, los machos tienen una aceleración en la edad epigenética en comparación con las hembras. Masser y col. en 2017 analizaron la metilación del ADN de todo el genoma en el hipocampo de ratón y la corteza frontal humana y reportaron sitios CpG que muestran diferentes niveles de metilación del ADN entre hombres y mujeres de por vida (referidos como diferencias sexuales) y sitios CpG que se ven afectados de manera diferente por el envejecimiento en hombres y mujeres (referidos como divergencia sexual). La gran mayoría de los estudios de EWAS sobre el envejecimiento se han realizado con sangre total, pero el sexo generalmente se ha exiliado como un factor de confusión y se ha utilizado para ajustar los datos de metilación del ADN. En este proyecto, con la cantidad de muestras investigadas, los porcentajes de metilación más altos es en los hombres, en los grupos donde se cuenta con los dos géneros (Yusipov et. al, 2020).

A pesar de estas limitaciones en la interpretación de los resultados de la metilación del ADN, tales marcadores epigenéticos, si son consistentes y replicables, podrían servir como poderosos biomarcadores que se pueden analizar a partir de tejidos mínimamente invasivos como la sangre circulante.

El análisis ANOVA en la tabla 6 muestra que hay una diferencia significativa entre los grupos

Tabla 6. Análisis de varianza de un factor.

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	3.58681613	4	0.89670403	4.3889011	0.0263449	3.4780497
Dentro de los grupos	2.04311742	10	0.20431174			
Total	5.62993354	14				

Menor a 0.05

Para evaluar si las observaciones proceden de poblaciones con la misma varianza, se realizó una prueba post hoc siguiendo un test de Bartlett, los resultados mostrados en la tabla 7, el *valor p* es mayor de 0.05, con un nivel de confianza (α) de 0.05 y grados de libertad $GL = 4$; entonces se considera que hay evidencias suficientes para rechazar la heterocedasticidad en favor de la homocedasticidad; por lo tanto, la diferencia encontrada en ANOVA es debida a las características investigadas (relación mayor metilación en pacientes que fuman y/o con CA de pulmón).

Tabla 7. Prueba post hoc de Bartlett.

Número de grupos	5	
Nivel de confianza (α)	0.05	

Grupos	Tamaño de muestra	Varianza
1	3	0.140437271
2	2	0.014496685
3	2	0.006619822
4	4	0.015750456
5	4	0.564625

Grados de libertad	Prueba estadística (T)	Valor de p
4	9.379526787	0.052282436

Si el *valor de p* es mayor que el nivel de significancia, la hipótesis nula de igualdad de varianzas es aceptada

Por tanto, las características en los cambios en la metilación del ADN, la convierte en un prometedor biomarcador, por su aparición temprana y frecuente en el cáncer, fácil detección mediante técnicas bien establecidas, estabilidad de la metilación del ADN en muestras fijas a lo largo del tiempo, presencia en diversos fluidos corporales, y especificidad de tipo celular, como se muestra en las investigaciones de los últimos años, algunas detalladas en la parte de abajo.

- Varios estudios recientes han encontrado que los cambios más profundos en el metiloma del cáncer relacionan la metilación del ADN, la metilación de histonas y la lámina nuclear, esto sugiere que los LAD, LOCK y PMD se

superponen en las células cancerosas, lo que refleja una amplia reorganización del genoma en el núcleo; los grandes bloques de ADN hipometilado que se encuentran en las células cancerosas corresponden a LAD y LOCK (Madakashira y Sadler, 2017).

- Las regiones genómicas repetitivas, que representan aproximadamente el 55% del genoma humano, son particularmente susceptibles a la pérdida de 5mC; estas secuencias incluyen elementos nucleares intercalados largos (LINE) y regiones repetitivas de tipo Alu (*Arthrobacter luteus*), dos tipos principales de elementos repetidos intercalados. Dado que la metilación del ADN y las marcas de cromatina represiva en forma de metilación de la histona H3K9 a menudo cooperan para silenciar las regiones genómicas repetitivas, la pérdida de metilación del ADN es probablemente una forma de permitir la activación de la expresión génica en las regiones repetitivas. Los estudios de secuenciación de los genomas del cáncer de varios cientos de pacientes revelaron que los tumores de una fracción sustancial de los pacientes tenían retro-transposiciones somáticas de los elementos LINE-1, se cree por tanto que estos eventos influyan en la tumorigénesis cambiando la estructura del genoma mediante mutagénesis de inserción (Pfeifer, 2018).
- En 2017, Hao, et al., evaluaron la utilidad de la metilación del ADN para diferenciar el tejido tumoral y el tejido normal para cuatro cánceres comunes (mama, colon, hígado y pulmón). Identificaron marcadores de cáncer en una cohorte de entrenamiento de 1619 muestras de tumores y 173 muestras de tejido normal adyacentes coincidentes. El análisis de metilación del ADN pudo predecir el cáncer frente al tejido normal con más del 95% de precisión, demostrando una precisión comparable a los métodos de diagnóstico típicos como la biopsia. Este análisis también identificó correctamente 29 de 30 metástasis de cáncer colorrectal en el hígado y 32 de 34 metástasis de cáncer colorrectal en el pulmón. Estos hallazgos demuestran la utilidad de los biomarcadores de metilación para la caracterización molecular del

cáncer, con implicaciones para el diagnóstico y el pronóstico (Hao, et al., 2017).

- A través de una búsqueda, utilizando perfiles de expresión génica y metilación del ADN derivado de la sangre dentro de un estudio de casos y controles (131 casos, 129 controles) anidado en una cohorte prospectiva de mujeres noruegas, Sandanger, et al. en 2018 encontraron 25 sitios CpG asociados con cáncer de pulmón; 23 se clasificaron como asociados con el tabaquismo (LC-AwS) y dos se clasificaron como no asociados con el tabaquismo (LC-non-AwS). Los perfiles de expresión génica demostraron que los sitios LC-AwS CpG tenían diferentes vías enriquecidas que los sitios LC-no AwS (Sandanger, et al., 2018).
- A través del análisis de secuenciación de inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP-seq) en 2018 Xu, et al., identificaron 3013 DMR en ADN libre de células (cfDNA) derivado de pacientes con cáncer de pulmón, con 2569 (85,3%) hipometilados y 445 (14,7%) hipermetilados. Tal observación fue consistente con el fenómeno bien conocido de que el genoma del cáncer se caracteriza por la desmetilación de todo el genoma. La metilación en los loci del promotor supresor de tumores es una fuerza impulsora en la tumorigénesis; descubrieron que solo una minoría de DMR hipermetilados estaba ubicada en regiones promotoras y una fracción considerable estaba ubicada en regiones intergénicas, lo que sugiere que la metilación del ADN puede regular la expresión génica de una manera más compleja a través de elementos reguladores distantes en el cáncer (Xu, et al., 2019).
- Las medidas biológicas de envejecimiento derivadas de la metilación del ADN en sangre han ganado una popularidad considerable como herramientas para comprender y predecir mejor las enfermedades. En 2020, Dugué, et al., investigaron la asociación entre las medidas de envejecimiento epigenético y el riesgo de siete tipos de cáncer utilizando datos del Melbourne Collaborative Cohort Study (MCCS). El riesgo de cáncer en general se incrementó entre un 4% y un 9% por aumento de cinco años en

la metilación "aceleración por edad", aunque estas estimaciones variaron según el tipo de cáncer. Consideraron dos medidas novedosas del envejecimiento biológico basadas en la metilación, llamadas PhenoAge y GrimAge, PhenoAge, edad, mortalidad entre individuos de misma edad calendario y biomarcadores clínicos.

GrimAge, paquetes-año de fumar y concentraciones plasmáticas de adrenomedulina, microglobulina beta-2, cistatina C, factor de diferenciación del crecimiento 15, leptina, inhibidor 1 de la activación del plasminógeno y metaloproteinasa inhibidora de tejidos.

La longitud de los telómeros es otro biomarcador del envejecimiento ampliamente utilizado, que muestra asociaciones poco claras con el riesgo de cáncer. Recientemente se desarrolló un predictor de la longitud de los telómeros basado en la metilación. En este estudio, el objetivo fue evaluar la asociación de las tres medidas de envejecimiento biológico antes mencionadas, calculadas con datos de metilación del ADN, y el riesgo de siete tipos de cáncer: colorrectal, gástrico, renal, pulmonar, prostático, urotelial y neoplasias de células B- maduras. Utilizaron un diseño prospectivo y en el análisis se incluyeron 3117 casos de cáncer y controles emparejados (edad, libres del cáncer de interés, sexo, país de nacimiento y antecedentes de tabaquismo).

Observaron asociaciones relativamente fuertes de PhenoAge ajustado por edad con el riesgo de cáncer colorrectal, de riñón, de pulmón, de células B maduras y urotelial (Riesgo relativo (RR) = 1.2-1.3). Se obtuvieron resultados similares para GrimAge ajustado por edad, pero la asociación con el riesgo de cáncer de pulmón fue mucho mayor (RR = 1.82, intervalo de confianza [IC] del 95% = 1.44 a 2.30), después del ajuste por tabaquismo, paquetes-año, edad de inicio, tiempo desde que dejó de fumar y otros factores de riesgo de cáncer. Llegaron a la conclusión de que las medidas basadas en la metilación PhenoAge y GrimAge pueden proporcionar información sobre

la relación entre el envejecimiento biológico y el cáncer y ser útiles para predecir el riesgo de cáncer, particularmente de pulmón (Dugué, et al., 2021).

Una pequeña parte del cáncer de pulmón en el mundo se desarrolla en personas sin factores de riesgo conocidos para la enfermedad. Algunos no tienen causa externa pueden ser solo eventos aleatorios, pero otros pueden deberse a factores que aún no conocemos. El cáncer de pulmón en las personas que no fuman suele ser diferente de los que se presentan en las personas que sí lo hacen. Tienden a desarrollarse en personas más jóvenes con ciertos cambios genéticos diferentes a los de los tumores que se encuentran en los fumadores; los genes pueden jugar un papel importante en algunas familias con antecedentes de cáncer de pulmón; algunas personas que heredan cambios en el cromosoma 6 por ejemplo, incrementan la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón, incluso si fuman un poco o no fuman. Algunas otras heredan mecanismos de reparación del ADN defectuosos que incrementan la probabilidad de que ocurran y mantengan cambios en el ADN. No todos tipos de cáncer de pulmón exponen los mismos cambios genéticos, por lo que indudablemente hay cambios en otros genes que aún no se han encontrado, aunque todas estas mutaciones también se podrían relacionar, con las modificaciones epigenéticas aberrantes heredables, como la metilación (American Cancer Society, 2019).

En el caso de los mexicanos y México-americanos, en 2018 Coker y cols. desarrollaron una investigación sobre la metilación del ADN de LINEs y SINEs en cordones umbilicales, de madres de 18 años con mala nutrición; se asoció significativamente con la hipermetilación de LINE-1 y esta asociación posiblemente fue moderada por la calidad de la dieta materna durante el embarazo (Coker et al., 2018). El folato provee una fuente importante de grupos metilo, en 2020 Jansen y cols. mediante un estudio para el estudio de los ciclos circadianos, la nutrición y la metilación derivada de estos en estudiantes de 14 ± 2 años de edad; encontraron una asociación positiva entre la metilación de algunos genes de control del ciclo circadiano y la dieta a base de alimentos ricos en folato (menor metilación que

aqueños con dieta con menos folatos) (Jansen, y otros, 2020). La variante de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) 677C → T es un determinante importante de la nutrición del folato y puede influir en la metilación del ADN; en la población mexicana sana, las frecuencias más altas son la del homocigoto T, la cual se encuentra del 19.7% al 47.7% y la del alelo T, con una frecuencia del 30% al 60% (Audiffred et al., 2016). En 2006 Axume y cols. buscaron evaluar la influencia del genotipo MTHFR C677T en la metilación global del ADN leucocitario en mujeres mexicoamericanas jóvenes (18-45 años) (n = 43; 14 CC, 12 CT y 17 TT), las personas consumieron una dieta restringida en folato durante 14 semanas, y la metilación global del ADN leucocitario se evaluó en la semana 0, 7 y 14; la metilación del ADN fue menor (P <0.05) en mujeres con el genotipo MTHFR 677TT en relación con el genotipo CT o CC; al retomar la ingesta de los niveles de folato, la metilación siguió baja, a pesar de que se detectaron mejoras significativas en los índices de folato en sangre. El retraso en la respuesta de metilación del ADN a la ingesta de folato puede estar relacionado, en parte, con la muy lenta renovación in vivo de las reservas de folato de todo el cuerpo, en general, los datos sugieren que el genotipo MTHFR 677TT y el folato interactúan para reducir los patrones de metilación del ADN leucocitario global en mujeres jóvenes mexicoamericanas (Axume, et al; 2006).

7. CONCLUSIONES

Después de realizar un análisis ANOVA unidireccional, se observó una diferencia estadística significativa entre los grupos ($p < 0.05$), teniendo los resultados más altos en exfumadores y fumadores en los jóvenes y los pacientes con cáncer de pulmón. Este hallazgo sugiere, con base a los datos de edad, número de cigarrillos, período de exposición, etc.; que los porcentajes o cambios importantes en la metilación del ADN pueden deberse a la dosis y/o exposición prolongada al humo del cigarrillo, ya que en los estudios relacionados a la dieta y/o mutaciones de MTHFR en mexicanos, se esperaría una baja metilación; estos hallazgos, podrían ayudar a comenzar a clasificar el porcentaje de riesgo del ADN metilado de la sangre periférica.

La metilación del ADN es uno de los cambios epigenéticos en el cáncer mejor estudiados, ya que casi todos los tipos de cáncer investigados muestran una pérdida de metilación del ADN que se extiende por la mayor parte del genoma. La reorganización del núcleo de las células cancerosas crea características morfológicas críticas para la estadificación patológica de los tumores; además, los cambios en el paisaje mutacional y epigenético en las células cancerosas alteran la estructura y estabilidad del genoma y contribuyen directamente a la malignidad.

La epigenética ha tomado una posición de interés en el entendimiento de esta enfermedad, aunado a los años de investigación de los daños del tabaquismo en el organismo y en el ADN, los resultados de este proyecto proporcionan una base que puede ayudar en el futuro de la práctica del tratamiento del cáncer de pulmón.

El inicio y progresión del cáncer son pasos claves para el diagnóstico, decidir el tratamiento y la posible recuperación del paciente.

El tabaquismo y el tabaquismo pasivo son los factores de riesgo más importantes relacionados con esta enfermedad; y al no provocar ningún signo o síntoma inicial, es imperativa la necesidad de estudios que nos ayuden en el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, T. y Quintero C. (2016). *Efectos neurobioquímicos de la nicotina en el cerebro humano*. Obtenido de Organo Científico Estudiantil de Ciencias Médicas de Cuba: <https://www.medigraphic.com/pdfs/abril/abr-2015/abr15260d.pdf>
- Alexandrov, L., Seok, J., Haase, K., Van, P., Martincorena, I., Nik-Zaina, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., Campbel, P., Vineis, P., Phillips, D. y Stratton, M. (2016). *Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer*. Obtenido de Science: <https://doi.org/10.1126/science.aag0299>
- Allen, A., Oncken, C. y Hatsukami, D. (2016). *Women and smoking: The effect of gender on the epidemiology, health effects, and cessation of smoking*. Obtenido de NCBI: <https://doi.org/10.1007/s40429-013-0003-6>
- Amat, J. (2016). *ANOVA análisis de varianza para comparar múltiples medias*. Obtenido de Ciencia de datos: https://www.cienciadedatos.net/documentos/19_anova
- American Cancer Society. (2019). *What Causes Lung Cancer?* Obtenido de American Cancer Society: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/causes-risks-prevention/what-causes.html>
- Arcavi, L. y Benowitz, N. (2004). *Cigarette smoking and infection*. Obtenido de Jama Internal Medicine: <https://doi.org/10.1001/archinte.164.20.2206>
- Atdbio. (2016). *Epigenetics*. (Atdbio Ltd) Obtenido de atdbio: <http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>
- Audiffred J. , R. I., García Cobián, T. A., García de Alba G. , J. E., y Rubio A., E. D. (2016). *Asociación del polimorfismo MTHFR C677T con la predominancia sintomatológica en una muestra de pacientes con esquizofrenia de Jalisco, México*. Obtenido de Acta universitaria, Scielo: <https://doi.org/10.15174/au.2016.838>
- Axume, J., Smith, S. S., Pogribny, I. P., Moriarty, D., y Caudill, M. (2006). *The MTHFR 677TT genotype and folate intake interact to lower global leukocyte DNA methylation in young Mexican American women*. Obtenido de Nutrition Research: [10.1016/j.nutres.2006.12.006](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.12.006)
- Balhara, Y. y Sarkar, S. (2016). Chapter 34 - Cotinine urinalysis for tobacco use. Obtenido de Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse:

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800213-1.00034-1>
- Bartlett, A., Liang, J., Sandoval, J., Fowke, J., Simonsick, E., Johnson, K. y Mozhui, K. (2019). *Longitudinal study of leukocyte DNA methylation and biomarkers for cancer risk in older adults*. Obtenido de Biomarker Research: <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0161-3>
- Baylin, S. y Jones, P. (2011). *A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications*. Obtenido de Nature Reviews Cancer: <https://doi.org/10.1038/nrc3130>
- Benowitz, N. (2010). *Nicotine addiction*. Obtenido de The New England Journal of Medicine: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra0809890>.
- Biswas, S. y Rao, C. (2017). *Epigenetics in cancer: Fundamentals and beyond*. Obtenido de Pharmacology & Therapeutics Elsevier: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>
- Bollepalli, S., Korhonen, T., Kaprio, J., Anders, S. y Ollikainen, M. (2019). *EpiSmokEr: a robust classifier to determine smoking status from DNA methylation data*. Obtenido de Epigenomics Future Medicine: <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0206>
- Bravo, A., González, C. y Le Borgne, S. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular*. Obtenido de Universidad Autónoma Metropolitana. http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/Manual_de_Prcticas_de_BM.pdf
- Caliri, A., Caceres, A., Tommasi, S. y Besaratinia, A. (2020). *Hypomethylation of LINE-1 repeat elements and global loss of DNA hydroxymethylation in vapers and smokers*. Obtenido de Journal Epigenetics: <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1724401>
- Cardial, G., Penteado, J., Renó, U., Fernandes, T. y Menezes, E. (2019). *A Landscape of epigenetic regulation by microRNAs to the hallmarks of cancer and cachexia: implications of physical activity to tumor regression*. Obtenido de IntechOpen: <https://doi.org/10.5772/intechopen.84847>
- Charvel, S., Cobo, F., Hernández, M., Reynales, L., Salas, J., Arrieta, O., Santillán, P., Roldán, J., Pérez, R., Escudero, P. y Segú, J. (2018). *Necesidades de cobertura y atención del cáncer pulmonar en México*. Obtenido de Salud Publica de México: <https://doi.org/10.21149/10114>
- Ciccarone, F., Tagliatesta, S., Caiafa, P., y Zampieri, M. (2018). *DNA methylation*

- dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms?*
 Obtenido de Mechanisms of Ageing and Development:
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.12.002>
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. Mexico: ISBN: 978-607-8246-72-4. Obtenido de Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcologia%20C3%ADa.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcologia%20C3%ADa.pdf)
- Comisión Nacional contra las Adicciones. (2020). *Información técnico-científica actualizada sobre el impacto del consumo de tabaco y la exposición a su humo por cada entidad federativa*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/salud/conadic/documentos/informacion-tecnica-y-cientifica-sobre-el-consumo-de-tabaco-y-la-exposicion-a-su-humo-por-cada-entidad-federativa>
- Coker, E. S., Gunier, R., Huen, K., Holland, N., y Eskenazi, B. (2018). *DNA methylation and socioeconomic status in a Mexican-American birth cohort*. Obtenido de Clinical Epigenetics: <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0494-z>
- Cui, H., Yurteri, C., Cabot, R., Xie, F. y Liu, H. (2019). *Characterization of mainstream cigarette smoke aerosol by size-fractionated chemical analysis of nicotine, solanesol, and tobacco-specific nitrosamines*. Obtenido de Particulate Science and Technology: <https://doi.org/10.1080/02726351.2019.1567636>
- Cupisti, S., Häberle, L., Dittrich, R., Oppelt, P., Reissmann, C., Kronawitter, D., Beckmann, M. y Mueller, A. (2010). *Smoking is associated with increased free testosterone and fasting insulin levels in women with polycystic ovary syndrome, resulting in aggravated insulin resistance*. Obtenido de Fertility and Sterility: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.062>
- Delgado, M. (2009). *Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer*. Obtenido de Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia: <https://core.ac.uk/download/pdf/230316712.pdf>
- Denis, H., Ndlovu, M. y Fuks, F. (2011). *Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms*. Obtenido de European

- molecular biology organization: <https://doi.org/10.1038/embor.2011.110>
- Dugué, P., Bassett, J., Joo, J., Li, Shuai, Y., Chenglong, D., Makalic, E., Wong, N., Buchanan, D., Hodge, A., English, D., Hopper, J., Giles, G., Southey, M. y Milne, R, (2021). *Biological aging measures based on blood DNA methylation and risk of cancer: A prospective study*. Obtenido de JNCI Cancer Spectrum: <https://doi.org/10.1093/jncics/pkaa109>
- Epigentek. (2017). *MethylFlash methylated DNA 5-mC quantification kit (Colorimetric)*. Obtenido de Epigentek Complete Solutions for Epigenetics: <https://www.epigentek.com/docs/P-1034.pdf>
- Fajardo, A., Piazza, G. y Tinsley, H. (2014). *The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: Targets for prevention and treatment*. Obtenido de Cancers: <https://doi.org/10.3390/cancers6010436>
- Freudenheim, J., Shields, P., Song, M. y Smiraglia, D. (2019). *DNA methylation and smoking: Implications for understanding*. Obtenido de Cancer Epidemiology Springer Nature Switzerland: <https://doi.org/10.1007/s40471-019-00191-8>
- Furujo, M., Kubo, T., Kinoshita, M. y Nagao, M. (2018). *Diagnostic value of the MAT1A gene mutations in methionine adenosyltransferase I/III deficiency: possible relevance to various neurological manifestations*. Obtenido de Neuropsychiatry.org: <https://doi.org/10.4172/Neuropsychiatry.1000492>
- García, B., Marrero, G., Llanes, M. y Mirabal, N. (2015). *Influencia del hábito de fumar en la aparición de modificaciones histológicas del epitelio respiratorio*. Obtenido de Revista 16 de Abril: <https://www.medigraphic.com/pdfs/abril/abr-2015/abr15259e.pdf>
- García, A., Anduro, I., Pérez, C., Corella, M., Rascón, M. y Astiazaran, H. (2020). *Quantification of DNA through the NanoDrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA*. Obtenido de International Journal of Analytical Chemistry: <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>
- Green, M. y Sambrook, J. (2018). *Isolation and quantification of DNA*. Obtenido de Cold Spring Harbor Protocols: <https://doi.org/10.1101/pdb.top093336>
- Green, M. y Sambrook, J. (2019). *Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis*. Obtenido de Cold Spring Harbor Protocols: <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>
- Guardiola, M., Vallvé, J., Zaina, S. y Ribalta, J. (2015). *Epigenética en la*

- arteriosclerosis*. Obtenido de Clínica e Investigación en Arteriosclerosis: <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2015.04.002>
- Handy, D., Castro, R., y Loscalzo, J. (2012). *Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease*. Recuperado el 11 de November de 2016, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107542/>
- Hao, X., Luo, H., Krawczyk, M., Wei, W., Wang, W., Wang, J., Flagg, K., Hou, J., Zhang, H., Yi, S., Jafari, M., Lin, D., Chung, C., Caughey, B. A., Li, G., Dhar, D., Shi, W., Zheng, L., Hou, R., ..., Zhang, K. (2017). *DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers*. Obtenido de Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: <https://doi.org/10.1073/pnas.1703577114>
- Ijsselsteijn, R., Jasen, J. y de-Wind, N. (2020). DNA mismatch repair-dependent DNA damage responses and cancer. Obtenido de DNA repair: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102923>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía . (2017). *Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer (4 de Febrero)*. Obtenido de INEGI: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). *Características de las defunciones registradas en México durante 2018*. Obtenido de INEGI <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSocioDemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
- Jansen, E. C., Dolinoy, D., Peterson, K. E., O'Brien, L. M., Chervin, R. D., Cantoral, A., . . . Goodrich, J. (2020). *Adolescent sleep timing and dietary patterns in relation to DNA methylation of core circadian genes: a pilot study of Mexican youth*. Obtenido de Epigenetics: <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1827719>
- Joehanes, R., Just, A., Marioni, R., Pilling, L., Reynolds, L., Mandaviya, P., Guan, W., Xu, T., Elks, C., Aslibekyan, S., Moreno, H., Smith, J., Brody, J., Dhingra, R., Yousefi, P., Pankow, J., Kunze, S., Shah, S., McRae, A., ... London, S. (2016). *Epigenetic signatures of cigarette smoking*. Obtenido de Circulation: Genomic and Precision Medicine: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/circgenetics.116.001506>

- John, E., Coburn, S., Liu, C., McAughey, J., Mariner, D., McAdams, K., Bakos, I. y Dóbé, S. (2020). *Gas-particle partitioning of formaldehyde in mainstream cigarette smoke*. Obtenido de Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research: <https://doi.org/10.2478/cttr-2020-0002>
- Katevatis, C., Fan, A. y Klapperich, C. (2017). *Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase*. Obtenido de PLOS ONE: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>
- Konstantinou, E., Fotopoulou, F., Drosos, A., Dimakopoulou, N., Zagoriti, Z., Niarchos, A., Makrynioti, D., Kouretas, D., Farsalinos, K., Lagoumintzis, G. y Poulas, K. (2018). *Tobacco-specific nitrosamines: A literature review*. Obtenido de Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.008>
- Krause, B., Castro, J., Uauy, R. y Casanello, P. (2016). *Conceptos generales de epigenética: proyecciones en pediatría*. Obtenido de Revista chilena de pediatría: <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.12.002>
- Kumar, S., Chinnusamy, V. y Mohapatra, T. (2018). *Epigenetics of modified DNA bases: 5-Methylcytosine and beyond*. Obtenido de Epigenomic and Epigenetic Frontiers in Genetic: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00640>
- Lai, W. y Pugh, B. (2017). *Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication*. Obtenido de Nature Reviews Molecular Cell Biology: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.47>
- Lee, K., y Pausova, Z. (2013). *Cigarette smoking and DNA methylation*. Obtenido de Frontiers in Genetics: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00132>
- Leon, M., Peruga, A., McNeill, A., Kralikova, E., Guha, N., Minozzi, S., Espina, C. y Schüz, J. (2015). *European code against cancer, 4th edition: tobacco and cancer*. Obtenido de Cancer epidemiology: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.06.001>
- Li, J. (2016). *Combinatorial epigenetic regulation of non-coding RNAs has profound effects on oncogenic pathways in breast cancer subtypes*. Obtenido de Oxford Academic: <https://doi.org/10.1093/bib/bbw099>
- Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J., Song, S., Jiang, Y., Xia, Q., Swinnen, J., Bormans, G., Himmelreich, U., Oyen, R. y Ni, Y. (2015).

- Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research.* Obtenido de Quantitative Imaging in Medicine and Surgery: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01>
- Long, H., King, H., Patient, R., Odom, D. y Klose, R. (2016). *Protection of CpG islands from DNA methylation is DNA-encoded and evolutionarily conserved.* Obtenido de Nucleic acids research: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw258>
- Lu, Y., Li, S., Zhu, S., Gong, Y., Shi, J. y Xu, L. (2017). *Methylated DNA/RNA in body fluids as biomarkers for lung cancer.* Obtenido de Biological Procedures Online: <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0051-8>
- Luo, J., Margolis, K., Wactawski-Wende, J., Horn, K., Messina, C., Stefanick, M., Tindle, H., Tong, E. y Rohan, T. (2011). *Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study.* Obtenido de BMJ: <https://doi.org/10.1136/bmj.d1016>
- Luperchio, T., Wong, X. y Red, K. (2014). *Genome regulation at the peripheral zone: lamina associated domains in development and disease.* Obtenido de Current Opinion in Genetics & Development: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.021>
- Madakashira, B. y Sadler, K. (2017). *DNA Methylation, Nuclear Organization, and Cancer.* Obtenido de Frontiers in Genetics: <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00076>
- Madani, A., Katharina, A., Richter, M. y Krüger, K. (2018). *Immune-regulating effects of exercise on cigarette smoke-induced inflammation.* Obtenido de Journal of Inflammation Research: <https://doi.org/10.2147/JIR.S141149>
- Maeda, M., Taisuke, K., Yang, S., y Shuichi, T. (2018). *Biomaterials for Immunoengineering.* Obtenido de Advanced Healthcare Materials: <https://doi.org/10.1002/adhm.201801243>
- McMahon, K., Karunasena, E. y Ahuja, N. (2017). *The roles of DNA methylation in the stages of cancer.* Obtenido de Cancer Journal: <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000279>
- Molero, A. y Muñoz, J. (2005). *Psicofarmacología de la nicotina y conducta adictiva.* Obtenido de Elsevier: [https://doi.org/10.1016/S1575-0973\(05\)74521-9](https://doi.org/10.1016/S1575-0973(05)74521-9)
- Morrow, J., Make, B., Regan, E., Han, M., Hersh, C., Tal, R., Quackenbush, J., Choi,

- A., Silverman, E. y DeMeo, D. (2020). *DNA methylation is predictive of mortality in current and former smokers*. Obtenido de American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine: <https://doi.org/10.1164/rccm.201902-0439OC>
- National Cancer Institute. (2015). *What is cancer?* Obtenido de National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- National Cancer Institute. (2017). *Surveillance, epidemiology, and end results program*. Obtenido de NIH: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
- National Library of Medicine. (2020). *What is epigenetics?* Obtenido de Genetics Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/epigenome>
- Nwanaji, J. y Colicino, E. (2020). *DNA methylation–based biomarkers of environmental exposures for human population studies*. Obtenido de Springer Nature Switzerland: <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00269-2>
- Oliveira, D. y Bravo, D. (2020). *ADRB2 (adrenoceptor beta 2, surface)*. Obtenido de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <https://doi.org/10.4267/2042/54033>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Cáncer*. Obtenido de OMS: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2017b). *Tabaco nota descriptiva No.339*. Obtenido de OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/>
- Organización Mundial de la salud. (2018). *Cáncer*. Obtenido de OMS: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Declaración de la OMS: consumo de tabaco y COVID-19*. Obtenido de OMS: <https://www.who.int/es/news-room/detail/11-05-2020-who-statement-tobacco-use-and-covid-19>
- Organización Panamericana de la Salud (2016). *Informe sobre control de tabaco en la región de las Americas*. Obtenido de Organización mundial de la salud para el control del tabaco: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/28380/9789275318867_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1
- Organización Panamericana de la Salud. (2020). *Perfiles de país sobre cáncer, 2020*. Obtenido de OPS: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1

5716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es

- Osborne, G., Rudel, R. y Schwarzman, M. (2015). *Evaluating chemical effects on mammary gland development: A critical need in disease prevention*. Obtenido de Reproductive Toxicology: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.07.077>
- Otzen, T. y Manterola, C. (2017). *Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio*. Obtenido de International journal of morphology: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100037>
- Pehote, G., Bodas, M., Brucia, K. y Neeraj, V. (2017). *Cigarette smoke exposure inhibits bacterial killing via TFEB-mediated autophagy impairment and resulting phagocytosis defect*. Obtenido de Hindawi: <https://doi.org/10.1155/2017/3028082>
- Pfeifer, G. (2018). *Defining driver DNA methylation changes in human cancer*. Obtenido de International Journal of Molecular Sciences: <https://doi.org/10.3390/ijms19041166>
- Pérez, A. (1995). *Naturaleza del humo del tabaco. Farmacología de la nicotina*. Obtenido de Archivos de bronconeumología: [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(15\)30955-8](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(15)30955-8)
- Pineda, R., García, M., Ochoa, A., y Hernández, J. (2020). *Análisis y perspectivas sobre la pandemia de COVID-19 en Querétaro*. Obtenido de CONCYTEQ: <http://www.concyteq.edu.mx/concyteq/uploads/publicacionArchivo/2020-10-2772.pdf>
- Qiagen. (2012). *Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016, de <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en>
- Reynales, L., Zavala, L., Paz, W., Gutiérrez, D., García, J., Rodríguez, M., Gutiérrez, J., Franco, A., Romero, M., Mendoza, L. (2017). *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017: Reporte de Tabaco*. Obtenido de Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública, Comisión Nacional Contra las Adicciones, Secretaría de Salud: https://encuestas.insp.mx/ena/encodat2017/reporte_encodat_tabaco_2016_2017.pdf
- Romanek, K., Galczynski, K., Adamiak, A., Rechberger, T. y Potawski, K. (2016).

- Metylacja DNA i aktywnosc DNA metylotransferazy (DNMT1) w raku blony sluzowej macicy.* Obtenido de Ginekologia Polska: <https://doi.org/10.17772/gp/60556>
- Sandanger, T., Nøst, T., Guida, F., Rylander, C., Campanella, G., Muller, D., Dongen, J., Boomsma, D., Johansson, M., Vineis, P., Vermeulen, R., Lund, E. y Chadeau, M. (2018). *DNA methylation and associated gene expression in blood prior to lung cancer diagnosis in the norwegian women and cancer cohort.* Obtenido de Scientific reports: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34334-6>
- Sanner, T. y Grimsrud, T. (2015). *Nicotine: carcinogenicity and effects on response to cancer treatment - a review.* Obtenido de Frontiers in oncology: <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00196>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2003). *Norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental - salud ambiental - residuos peligrosos biológico-infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo.* Obtenido de Secretaria de Salud: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
- Secretaría de Salud. (2015). *El consumo del tabaco es la principal causa de defunción prevenible en el mundo.* Obtenido de Secretaría de Salud: <http://www.gob.mx/salud/articulos/infografia-tabaquismo?state=published>
- Secretaría de Salud. (2020). *Prevención y detección temprana disminuyen mortalidad por cáncer.* Obtenida de Secretaría de Salud Gobierno de México: <https://www.gob.mx/salud/prensa/041-prevencion-y-deteccion-temprana-disminuyen-mortalidad-por-cancer>
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2019). *¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?* Obtenido de Sociedad Española de Oncología Médica: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?start=2>
- Song, M., Freudenheim, J., Brasky, T., Mathe, E., McElroy, J., Nickerson, Q., Reisinger, S., Smiraglia, D., Weng, D., Ying, K., Wewers, M. y Shields, P. (2020). *Biomarkers of exposure and effect in the lungs of smokers, nonsmokers, and electronic cigarette users.* Obtenido de American Association for Cancer Research: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-19-1245>

- Stampfli, M. y Anderson, G. (2009). *How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer*. Obtenido de Nature reviews Immunology: <https://doi.org/10.1038/nri2530>
- Subhankar, B. y Rao, C. (2017). *Epigenetics in cancer: Fundamentals and beyond*. Obtenido de Pharmacology & Therapeutics Elsevier: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>
- Tontonoz, M. (2018). *How do cigarettes cause cancer?* Obtenido de Memorial Sloan Kettering Cancer Center: <https://www.mskcc.org/blog/how-do-cigarettes-cause-cancer>
- Tsai, P., Glastonbury, C., Eliot, M., Bollepalli, S., Yet, I., Castillo, J., Carnero, E., Hardiman, T., Martin, T., Vickers, A., Mangino, M., Ward, K., Pietiläinen, K. H., Deloukas, P., Spector, T., Viñuela, A., Loucks, E., Ollikainen, M., ... Bell, J. (2018). *Smoking induces coordinated DNA methylation and gene expression changes in adipose tissue with consequences for metabolic health*. Obtenido de Clinical epigenetics: <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0558-0>
- Weeden, C. y Asselin, M. (2018). *Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation*. Obtenido de Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.015>
- Weinberg, R. (2006). *The biology of cancer* (2a. ed.). New York USA: Garland Science. https://www.academia.edu/44118315/The_Biology_of_Cancer_R_Weinberg
- What is Epigenetics. (2016). *DNA methylation*. Obtenido de GEN. [https://www.whatisepigenetics.com/dna-methylation/#:~:text=DNA%20methylation%20is%20an%20epigenetic,genes%20and%20affecting%20gene%20expression.&text=When%20a%20CpG%20island%20in,\(it%20is%20turned%20off\)](https://www.whatisepigenetics.com/dna-methylation/#:~:text=DNA%20methylation%20is%20an%20epigenetic,genes%20and%20affecting%20gene%20expression.&text=When%20a%20CpG%20island%20in,(it%20is%20turned%20off)).
- Wojtczyk, M. y Schlichtholz, B. (2019). *Tobacco carcinogens and the methionine metabolism in human bladder*. Obtenido de Mutation Research-Reviews in Mutation Research Elsevier: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.06.001>
- Xu, W., Lu, J., Zhao, Q., Wu, J., Su, J., Han, B., Zhao, X. y Kang, Y. (2019). *Genome-wide plasma cell-free DNA methylation profiling identifies potential biomarkers for lung cancer*. Obtenido de Disease Markers:

<https://doi.org/10.1155/2019/4108474>

- Park, SY y Kim, JS. (2020). *A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes*. Obtenido de *Experimental & Molecular Medicine* 52. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4>
- Yu, V., Rahimy, M., Korrapati, A., Xuan, Y., Zou, A., Krishnan, A., Tsui, T., Aguilera, J., Advani, S, Crotty A., Brumund, K., Wang, J. y Ongkeko, W. (2016). *Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death*. Obtenido de *Elsevier Oral Oncology*: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.10.018>
- Yusipov, I., Bacalini, M. G., Kalyakulina, A., Krivonosov, M., Pirazzini, C., Gensous, N., Ravaioli, F., Milazzo, M., Giuliani, C., Vedunova, M., Fiorito, G., Gagliardi, A., Polidoro, S., Garagnani, P., Ivanchenko, M., y Franceschi, C. (2020). *Age-related DNA methylation changes are sex-specific: a comprehensive assessment*. Obtenido de *Aging*: <https://doi.org/10.18632/aging.202251>
- Zhu, X., Li, J., Deng, S., Yu, K., Liu, X., Deng, Q., Sun, H., Zhang, X., He, M., Guo, H., Chen, W., Yuan, J., Zhang, B., Kuang, D., He, X., Bai, Y., Han, X., Liu, B., Li, X., ...Liang, L. (2016). *Genome-wide analysis of DNA methylation and cigarette smoking in a chinese population*. Obtenido de *Environmental Health Perspectives*: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1509834>

9. ANEXOS

9.1. Recursos financieros de apoyo al proyecto (FOPER)

El proyecto contó con el financiamiento del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría FOPER- 2017, el cual tiene el propósito de contribuir a la formación de los estudiantes de la Universidad Autónoma de Querétaro, mediante el desarrollo de proyectos en las diferentes áreas del conocimiento; que impacten en la calidad de vida de la comunidad universitaria y de los Queretanos.

9.2. 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 quedándose una copia del mismo.

La obligación ética en la publicación de los resultados obtenidos de este estudio transversal comparativo de asociación de la metilación de ADN y el tabaquismo, así como el respeto a la confidencialidad y privacidad de los participantes, recae sobre los investigadores, ninguna persona sin autorización podrá conocer los datos o tener acceso a ellos. La información acerca de las personas que se recojan en esta investigación se mantendrá confidencial, en cabina con llave; solo los investigadores tendrán acceso a verla; dicha información será identificada por un número en lugar del nombre personal y no será compartida ni entregada a nadie.

Las muestras derivadas de este estudio se almacenarán en un laboratorio de la Facultad de Química de la UAQ por un plazo limitado de tiempo, hasta concluir esta investigación, después se destruirá toda la muestra, siguiendo las indicaciones descritas en el punto de manejo de residuos biológico infecciosos. El acceso a las muestras solo podrá realizarse bajo la conformidad del investigador que tiene asignada la responsabilidad de custodiarlas. Es importante resaltar que la información derivada de estas muestras se usará para los fines de esta única investigación.

La interpretación clínica de los resultados personales se dará a conocer al paciente si así lo requiriera o a la persona autorizada por el mismo en el consentimiento

informado por el Médico de Medicina Interna de la Facultad de Química, Dr. Gregorio Gustavo Guerrero Rodríguez.

Este protocolo fue sometido a revisión por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, antes del inicio del mismo, para sus observaciones y aprobación.

9.3 Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI)

Con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; los residuos se deberán separar y envasar, de acuerdo con sus características físicas (líquido o sólido) y biológicas infecciosas. La sangre líquida y sus derivados que vayan a ser desechados, serán envasados en recipientes herméticos de color rojo resistentes a las fracturas y pérdidas de contenido al caerse, con tapa hermética y con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS LIQUIDOS BIOLOGICO-INFECCIOSOS", marcados con el símbolo universal de riesgo biológico ver figura 29. Los objetos punzocortantes en recipientes rígidos de polipropileno de color rojo, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico. Los recipientes para los residuos peligrosos punzocortantes y líquidos se llenarán hasta el 80% de su capacidad, asegurándose los dispositivos de cierre y no deberán ser abiertos o vaciados. Se deberá destinar un área para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos para evitar que se mezclen con la basura común, en contenedores metálicos o de plástico con tapa. Deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final, en la Facultad de Química la empresa encargada de este proceso es PIREBSA (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).



Figura 29. Símbolo universal de riesgo biológico (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).

9.3 Formulario para participantes



Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química

Formulario para la realización del estudio sobre “Establecer el porcentaje de metilación del ADN en sangre periférica ocasionado por el consumo del tabaco”

Este formulario se basa en documento “Encuesta Mundial de Tabaquismo en Adulto” de la Organización Mundial de la Salud.

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 27.

Mencione si toma alguno de los siguientes medicamentos:
antipurinas (por ejemplo, azatioprina), fármacos de quimioterapia o antifolatos (por ejemplo, metotrexato) y antibióticos sulfonamida

Actúan sobre el DNA	Antimetabolitos
Antraciclínicos	
Daunorubicina	Metotrexate
Hidroxi-daunorubicina	Mercaptopurina
Idarubicina	Tioguanina
Otros	Arabinósido de Citosina
Mitoxantrone	Hidroxiurea
Bleomicina	
Alquilantes	Antipurinas
Ciclofosfamida	Fludarabina
Ifosfamida	Deoxicofomicina
Clorambucil	2-Deoxicloroadenosina
Melfalan	Inhibidores de enzimas que reparan DNA
Nitrosoureas(BCNU,CCNU)	Epipodofilotoxinas
Inhibidores de la mitosis	Otros
Vincristina	Corticoesteroides
Vindesina	L-Asparaginasa
Vinblastina	Agentes Biologicos

1. Nombre completo _____

2. Edad _____ 3. Sexo (F) (M)

4. Dirección en la ciudad de Querétaro _____

5. Lugar de procedencia _____

6. Correo electrónico _____

Antecedentes médicos personales			
Tabaquismo		Dieta principal	
8. Cigarros por día		Por ejemplo: Carbohidratos (pan, pasta, dulce, refresco) 3 veces al día	
9. Años fumando		19. Carbohidratos por día	
10. Si no fuma actualmente ¿ha fumado alguna vez?		20. Grasas por día	
11. Hace cuanto tiempo dejo de fumar		21. Proteínas por día	
12. Ha estado en contacto con personas que fuman en el último año		22. Cuantas comidas hace por día	
13. Cuantas horas al día se encuentra con personas que esten fumando		Ejercicio	
Alcoholismo		23. Deporte que practica	
14. Cuantas copas toma a la semana		24. Horas a la semana	
15. Cuantos años tiene usted consumiendo alguna bebida alcoholica		Medicamento	
Enfermedades cardiovasculares		25. Toma algún medicamento o suplemento	
16. Enfermedad diagnosticada		26. Menciona cuales	
17. Hace cuanto tiempo fue diagnosticado		27. Revise la lista de medicamentos especiales anexa y mencionar si toma alguno, dosis y por cuanto tiempo lo ha consumido	
Diabetes			
18. Hace cuanto tiempo fue diagnosticado			

Antecedentes familiares

28. ¿Algún pariente directo (padres, abuelos, hermanos) padecen o han padecido algún tipo de cáncer?
 (Si) (No) ¿Quién? _____

29. Tipo de cáncer

30. Tiempo de haber sido diagnosticado

Linea Materna		Linea Paterna	
31. Nombre de la madre		43. Nombre del padre	
32. Edad	33. ¿Vive? (Si) (No)	44. Edad	45. ¿Vive? (Si) (No)
34. Hace algún tipo de ejercicio (Si) (No)		46. Hace algún tipo de ejercicio (Si) (No)	
35. Horas a la semana		47. Horas a la semana	
35. Tipo de dieta (Respecto al punto 19-21)		48. Tipo de dieta (Respecto al punto 19-21)	
Tabaquismo		Tabaquismo	
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 cuanto tiempo dejo de fumar		52. Hace cuanto tiempo dejo de fumar	
Enfermedades cardiovasculares		Enfermedades cardiovasculares	
40. Enfermedad diagnosticada		53. Enfermedad diagnosticada	
41. Hace cuanto tiempo fue diagnosticado		54. Hace cuanto tiempo fue diagnosticado	
Diabetes		Diabetes	
42. Hace cuanto tiempo fue diagnosticado		55. Hace cuanto tiempo fue diagnosticado	

Línea Materna							
56. Nombre de la abuela				68. Nombre del abuelo			
57. Edad	58. ¿Vive?	(Si)	(No)	69. Edad	70. ¿Vive?	(Si)	(No)
59. Hace algún tipo de ejercicio.				71. Hace algún tipo de ejercicio			
(Si) (No)				(Si) (No)			
60. Horas a la semana				72. Horas a la semana			
61. Tipo de dieta (Respecto al punto 19-21)				73. Tipo de dieta (Respecto al punto 19-21)			
Línea Paterna							
62. Nombre de la abuela				74. Nombre del abuelo			
63. Edad	64. ¿Vive?	(Si)	(No)	75. Edad	76. ¿Vive?	(Si)	(No)
65. Hace algún tipo de ejercicio.				77. Hace algún tipo de ejercicio			
(Si) (No)				(Si) (No)			
66. Horas a la semana				78. Horas a la semana			
67. Tipo de dieta (Respecto al punto 19-21)				79. Tipo de dieta (Respecto al punto 19-21)			
80. Si alguno de sus abuelos padece de alguna de las siguientes enfermedades llenar los siguientes campos							
Parentesco				Parentesco			
Tabaquismo				Tabaquismo			
Cigarros por día				Cigarros por día			
Años fumando				Años fumando			
Si no fuma actualmente ¿ha fumado alguna vez?				Si no fuma actualmente ¿ha fumado alguna vez?			
Hace cuanto tiempo dejo de fumar				Hace cuanto tiempo dejo de fumar			
Enfermedades cardiovasculares				Enfermedades cardiovasculares			
Enfermedad diagnosticada				Enfermedad diagnosticada			
Hace cuanto tiempo fue diagnosticado				Hace cuanto tiempo fue diagnosticado			
Diabetes				Diabetes			
Hace cuanto tiempo fue diagnosticado				Hace cuanto tiempo fue diagnosticado			
Notas relevantes o algún comentario de salud importante del participante o familiares directos							

9.5 Consentimiento informado



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Consentimiento Informado para la realización del estudio sobre “Establecer el porcentaje de metilación del ADN en sangre periférica ocasionado por el consumo 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.

Promotor del estudio

Nombre: QFB Diana Monserrat Aguilar Beltrán

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 Diagnostica

Le invitamos a participar en el estudio que busca establecer el porcentaje de metilación del ADN ocasionado por el consumo del tabaco en alumnos de la Facultad de Química de la UAQ; para lo cual es importante que entienda porque es necesario este estudio, que 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 cambios epigenéticos en el ADN como la metilación, que de manera natural regulan la expresión génica, activando o silenciando genes implicados en la tumorigenesis. Esta investigación trata de establecer alguna evidencia clínica sobre la asociación entre estos cambios de metilación y el tabaquismo que permitiría proponer factores de riesgo implicados en desarrollo del cáncer de pulmón.

Resumen del estudio y participación:

Se propone desarrollar un estudio transversal comparativo, con 4 grupos de estudios (Fumadores activos, fumadores pasivos, exfumadores y no fumadores), para la detección cuantitativa de la metilación del ADN global y del gen *SMUG1* implicado en la reparación 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, historia médica de familiares directos (padres, hermanos y abuelos), hábitos de alimentación, actividad física y 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 asumir la reversibilidad del proceso de metilación aberrante:

- Positivo: Identificación de hipometilación en ADN e hipermetilación en el gen *SMUG1*. De acuerdo al conocimiento actual, este tipo de variantes se asocian con riesgo mayor de desarrollar ciertos tipos de cáncer o iniciar los procesos de tumorigénesis.
- Negativo: No se identifica variación en la metilación en ADN o en el gen *SMUG1* comparado con el control no fumador. Un resultado negativo no garantiza que no se tenga una alteración independiente de este estudio.
- 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 si en

cualquier momento se le detectase algún tipo de variación en la metilación del ADN; 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.

El Médico de Medicina Interna de la Facultad de Química de la UAQ Dr Gustavo Guerrero Rodríguez será el encargado 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 un laboratorio de la Facultad de Química de la UAQ hasta concluir la investigación antes mencionada, después se destruirá toda la muestra. 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 usará para los fines de esta única investigación.

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 porcentaje de metilación del ADN ocasionado por el consumo del tabaco, 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.

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: _____

Testigo: _____

Acepto participar de forma voluntaria en el estudio: "*Establecer el porcentaje de metilación del ADN en sangre periférica ocasionado por el consumo del tabaco*". **Si**
No

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. **Si** **No**

Comprendo que mi participación en el estudio consiste en: Donar una muestra de sangre para la cuantificación de la metilación de ADN global y del gen *SMUG1* . **Si**
No

Doy permiso para ser informado sobre los resultados de las pruebas de este estudio y que sean relevantes para mi salud. **Si** **No**

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. **Si** **No**

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. **Si** **No**

Sé cómo ponerme en contacto con los investigadores si lo necesito. **Si** **No**

Firma participante	
Firma de quien ha informado:	
Firma de testigo:	
Fecha (Día/mes/año):	