



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *runx3* Y ANÁLISIS DE VARIABLES CLÍNICO
PATOLÓGICAS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON
ADENOCARCINOMA DE PULMÓN EN EL HOSPITAL
CARLOS ANDRADE MARÍN, EN EL AÑO 2016

Autoras

Daniela Estefanía Corrales Aguilar
Michelle Elizabeth Sambache Flores

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *runx3* Y ANÁLISIS DE VARIABLES CLÍNICO
PATOLÓGICAS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON
ADENOCARCINOMA DE PULMÓN EN EL HOSPITAL CARLOS ANDRADE
MARÍN, EN EL AÑO 2016

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
stablecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Andrea Paola Cordero Arroyo

Autoras

Daniela Estefanía Corrales Aguilar

Michelle Elizabeth Sambache Flores

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, "Amplificación del gen *runx3* y análisis de variables clínico patológicas de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín, en el año 2016", a través de reuniones periódicas con las estudiantes Daniela Estefanía Corrales Aguilar y Michelle Elizabeth Sambache Flores, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Andrea Paola Cordero Arroyo

Master en Células Madre y Medicina Regenerativa

C.I. 1714669825

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, "Amplificación del gen *runx3* y análisis de variables clínico patológicas de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín, en el año 2016", de Daniela Estefanía Corrales Aguilar y Michelle Elizabeth Sambache Flores, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

María Gabriela Granja Bastidas

Master en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina:

Especialidad en Patología Molecular

C.I. 1712995149

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTIFICO

“Declaro haber dirigido científicamente a las estudiantes para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndoles con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Yanara Anahí Astudillo Silva

Master en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

CI. 1718870155

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

Daniela Estefanía Corrales Aguilar

CI. 1723255681

Michelle Elizabeth Sambache Flores

CI. 1721252441

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por su amor y apoyo incondicional, a mis tíos Pablin y Cony sin ustedes este sueño no habría comenzado, a mi abuelita Aida porque sin ella mi sueño no hubiese podido continuar y a Luquitas, ese pequeño ser que sin decir nada estuvo presente en los momentos más difíciles con su cariño y ternura incondicional.

Daniela

Agradezco a Dios por acompañarme en todo momento, especialmente en los más difíciles a lo largo de toda mi vida. A mis padres Blanca y René por ser el pilar y apoyo fundamental en cada paso que doy y permitirme llegar a cumplir uno de mis sueños. A mi adorado compañero de desvelos, Mike quien estuvo a mi lado en todo momento siempre con su amor incondicional. A ti Dani por compartir este desafío juntas y sobre todo por tu amistad durante todos estos años.

Michelle

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mis padres, mi perrhijo Luquitas, a mi familia y a todos quienes creen en esta carrera...sigan luchando.

Daniela

Dedico este trabajo a mis padres Blanca y René, a mi hermano Alexis y a mi amado Mike, el mejor regalo que la vida pudo darme y a quienes han confiado en mí y han sido mi inspiración a lo largo de este camino.

Michelle

RESUMEN

El adenocarcinoma de pulmón es el segundo tipo de cáncer diagnosticado en hombres y mujeres a nivel mundial, y el más mortal, este subtipo de cáncer se presenta en células no maduras moco productoras. El gen *runx3* es un factor de transcripción en patogenicidad tumoral y su inactivación mediante cambios epigenéticos por metilación, dan lugar a procesos de tumorigénesis en fases tempranas. El objetivo del estudio fue amplificar el gen *runx3* para determinar el estado de metilación del mismo y analizar las variables clínico patológicas de 45 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el 2016. Para lo cual se realizó una PCR específica de metilación y los productos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, además se analizaron las frecuencias de sexo, edad, hábito de fumar y estadio de la enfermedad mediante un análisis de independencia de variables con la prueba de chi cuadrado. El resultado presentó mayor frecuencia de padecer la enfermedad en pacientes sobre los 50 años, siendo el grupo de 66– 85 años el más afectado. Además, se encontró una mayor presencia de la enfermedad en pacientes del sexo femenino fumadoras y finalmente se encontró una frecuencia en porcentajes iguales el diagnóstico en estadios I y III de la enfermedad. La prueba de chi cuadrado para la asociación de las variables con el estadio de la enfermedad dio como resultado una independencia de las variables en todos los casos.

Palabras clave: adenocarcinoma de pulmón, gen *runx3*, PCR específica de metilación, factores clínico patológicos.

ABSTRACT

Lung adenocarcinoma is the second type of cancer diagnosed in men and women worldwide, and the most lethal, this subtype of cancer appears in immature mucus producing cells. The runx3 gene is a transcription factor in tumor pathogenicity and its inactivation by epigenetic changes by methylation, develops processes of early phase tumorigenesis. The objective of the study was the amplification of runx3 gene to determine its methylation status and analyze the clinical pathological variables of 45 patients diagnosed with lung adenocarcinoma at Carlos Andrade Marín Hospital in Quito, in 2016. To accomplish that we performed a methylation-specific PCR and the PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis, also, the frequencies of sex, age, smoking habit and stage of the disease were analyzed by an independent analysis of variables with chi-squared test. The results showed a higher frequency to suffer the disease in patients who were 50 years old and over, the most affected group belonged to patients who were 66-85 years old. In addition, a higher presence of the illness was found in female smokers and finally the frequency of patients who were diagnosed at stage I and III of the disease was found in equal percentages. The chi-squared test for the association between the variables and the stage of the disease resulted in independent variables in all cases.

Key words: Lung adenocarcinoma, Runx3 gene, methylation specific PCR, clinical pathological factors.

ÍNDICE

1.CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	6
2.CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1 EL CÁNCER.....	7
2.2. CÁNCER DE PULMÓN	8
2.2.1. Tipos de cáncer de pulmón	8
2.2.1.1. Cáncer de pulmón micrótico:	8
2.2.1.2. Cáncer de pulmón no micrótico:	9
2.2.2. Adenocarcinoma de pulmón.....	11
I. Adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA)	11
II. Adenocarcinoma Invasivo	11
III. Variantes de Adenocarcinoma.....	12
2.2.3. Cáncer de pulmón a nivel mundial	12
2.2.4. Cáncer de pulmón en Ecuador.....	13
2.2.5. Causas	13
a. Tabaquismo y fumadores pasivos	13
b. Alimentación	13
c. Contaminación	14
d. Exposición ocupacional	14
e. Oncológicas	14
2.2.6. Epigenética y cáncer de pulmón	15
2.2.7. Diagnóstico.....	16
I. Estudio por imagen.....	16

II. Biopsia de tejido	16
2.3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX	19
2.3.1. Miembros de la familia Runx	19
2.3.2. Gen runx3.....	20
2.3.3. runx3 y su relación con distintos tipos de cáncer	22
2.4. METILACIÓN DE RUNX3 Y SU RELACIÓN CON EL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN.	24
3.CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	25
4.CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	27
4.1. POBLACIÓN Y MUESTRA	27
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS	28
4.2.1. Obtención de datos	28
4.2.2. Obtención de muestras	28
4.2.3. Extracción de ADN	29
4.2.4. Cuantificación de ADN	31
4.2.5. Conversión de ADN con bisulfito de sodio	31
4.2.6. PCR específica de metilación.....	33
4.2.7. Electroforesis en gel de agarosa	36
4.3. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS.....	37
5.CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
5.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	39
5.2. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS CON EL ESTADIO DE LA ENFERMEDAD	46
5.3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN RUNX3 EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MEDIANTE PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN.....	50

6.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
6.1.CONCLUSIONES.....	59
6.2.RECOMENDACIONES	59
REFERENCIAS	61
ANEXOS	73

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

El cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado y con mayor mortalidad a nivel mundial. La Sociedad Americana Contra El Cáncer en Estados Unidos en el año 2014 estableció que se presentaron cerca de 224.390 nuevos casos de cáncer de pulmón, de los cuales 106.470 corresponden a pacientes de sexo femenino y 117.920 a pacientes de sexo masculino (*American Cancer Society*, 2014).

Además, se conoce que el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte en pacientes diagnosticados con cáncer, y según el primer Registro Nacional de Tumores de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) en el año 2014 se registraron 753 muertes por cáncer de pulmón, 432 en hombres y 321 en mujeres a nivel nacional, con una tasa de incidencia específicamente en Quito de 7.9 casos en hombres y 6 en mujeres por cada 100.000 habitantes, lo que le ubica al cáncer de pulmón como la tercera causa de muerte, superado solo por el cáncer de estómago y de próstata (Cueva, P., & Yépez, J, 2014).

De acuerdo con la Sociedad Americana Contra el Cáncer, en personas que fueron diagnosticadas con cáncer de pulmón no microcítico entre 1998 y 2000, se observó una tasa de supervivencia a 5 años de acuerdo al estadio de la enfermedad; así los pacientes que presentaban la enfermedad en estadio IA mostraron una tasa de supervivencia de aproximadamente 49%, en estadio IB 45%, estadio IIA 30%, en el estadio IIB 31%, en el estadio IIIA 14%, en estadio IIIB 5% y cuando el adenocarcinoma se ha extendido hacia otras partes del cuerpo o es un cáncer metastásico en estadio IV alrededor de 1% (*American Cancer Society*, 2014).

El cáncer de pulmón es un tipo de cáncer mortal, debido a que no existen técnicas de detección tempranas para su diagnóstico, y cuando se ha logrado realizar un diagnóstico la mayoría de las veces éste se encuentra en estadios avanzados, cuando las probabilidades de tratamiento son mínimas o incluso nulas (Amorín Kajatt, 2013).

De acuerdo a los síntomas y el resultado de los exámenes médicos convencionales el médico tratante puede deducir que el paciente padece cáncer. Dentro de los análisis que se realizan se encuentran: la prueba del esputo, el cual es analizado en un microscopio con la finalidad de determinar si existe la presencia de células cancerosas, la radiografía de tórax, que es uno de los primeros análisis que pedirá al paciente (Delbrück, 2002), y la tomografía computarizada que hace uso de rayos x con la finalidad de emitir imágenes transversales, además, de tomar varias imágenes al mismo tiempo y posteriormente estas imágenes son combinadas para formar secciones transversales del órgano que se está analizando, mostrando así el tamaño, forma y la ubicación del tumor en caso de presentarlo (Dennis & Mary, 2013). Adicionalmente, se realiza una biopsia de tejido con la finalidad de confirmar el diagnóstico del estudio por imágenes, este método es invasivo comparado con las técnicas realizadas para el estudio por imágenes (Orsini, 2000).

El gen *runx3*, el cual codifica para un factor de transcripción en el ámbito de la patogenicidad tumoral de ha convertido en un tema muy importante y relevante en el estudio de varios tipos de cáncer incluyendo el cáncer de pulmón. Su inactivación mediante mutaciones o silenciamiento epigenético; está presente frecuentemente en tumores sólidos de múltiples orígenes. Esto ha generado la teoría que la inactivación de este gen es de gran importancia dentro del proceso de tumorigénesis y que la misma se realiza en fases tempranas de la enfermedad y durante su desarrollo a estadios terminales (Chuang & Ito, 2010).

A pesar de que aún no se conoce el mecanismo mediante el cual su actividad cambia y pasa de ser un supresor tumoral a poseer actividad oncogénica, la inactivación de este gen es de interés clínico debido a que su identificación implica una detección temprana del cáncer, siendo además un factor pronóstico en la enfermedad (Chuang & Ito, 2010).

El gen *runx3* se encuentra dentro del cromosoma 1p36, región que coincide con un denominado “punto caliente” de deleciones en algunos tipos de cáncer de origen hematopoyético, epitelial y neural. Diversas investigaciones han analizado la frecuencia con la que este gen se silencia por metilación, lo que concede una

ventaja selectiva a las células cancerígenas y facilita su proliferación (Nakanishi et al., others, 2011).

En el estudio realizado por Koji Sato y colaboradores en el 2005 se evaluó la supresión del gen *runx3*, además del estado de metilación en 43 líneas celulares de cáncer de pulmón y 120 pertenecientes a cáncer de pulmón no micrótico; en donde se observó que *runx3* estuvo ausente en el 50% de las líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas, 50% de las líneas celulares de adenocarcinoma y en un 33.3% en las líneas celulares de carcinoma de células escamosas. Además, la frecuencia de metilación de *runx3* fue significativamente mayor en adenocarcinoma con 43.8% que las de cáncer de pulmón de células pequeñas que presentaron únicamente el 5%. Estos resultados indicaron que el silenciamiento del gen *runx3* tiene un papel importante en la patogénesis del cáncer de pulmón, y la metilación es un mecanismo importante de inactivación del gen *runx3* en adenocarcinoma del pulmón (Sato et al., 2006)

Al igual que, en el estudio realizado por Kunio Araki y colaboradores en 2005 en donde, se evaluó la expresión de *runx3* en 17 muestras de tejido, tanto de adenocarcinoma de pulmón como con tejido pulmonar no neoplásico; además, 98 muestras de tejido con adenocarcinoma de pulmón para evaluar la frecuencia con la que *runx3* se expresó. Se observó que *runx3* se expresó con mayor frecuencia en los carcinomas bronquioalveolares. Además, la tasa de supervivencia a cinco años fue significativamente mayor en los 50 pacientes con niveles más altos de expresión *runx3* que en los 48 pacientes con niveles más bajos. Concluyendo que la expresión de *runx3* en adenocarcinoma de pulmón podría presentar un papel fundamental en la progresión tumoral y la supervivencia de los pacientes (Araki et al., 2005).

Por otro lado, la investigación realizada con muestras de cáncer de pulmón y PCR específica de metilación identificó una frecuencia de metilación del 25%, además estableció que los pacientes que presentan metilación de este gen poseen una menor esperanza de vida en cualquier estadio de la enfermedad (Tume Farfán, 2015).

1.2. Planteamiento del problema

El segundo cáncer diagnosticado con mayor frecuencia tanto en hombres como en mujeres a nivel mundial es el cáncer de pulmón no microcítico o también denominado como adenocarcinoma, sin tener en cuenta al cáncer de piel. El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte en pacientes diagnosticados con cáncer, se conoce que una de cada cuatro muertes por cáncer es ocasionada por esta neoplasia maligna. Según datos exhibidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente alrededor de 158.080 personas en todo el mundo morirán por cáncer de pulmón, es decir cada año mueren más personas a causa de cáncer de pulmón que por cáncer de colon, mama y próstata juntos (OMS, 2015).

Actualmente, los métodos de diagnóstico a nivel mundial para el cáncer de pulmón son pocos y de costo muy elevado ya que se requiere de tecnología avanzada y de personal capacitado que no en todos los hospitales se podría encontrar. Según la Sociedad Americana del Cáncer, existen tres métodos diagnósticos para el cáncer de pulmón: la citología del esputo, la radiografía de tórax y la tomografía computarizada. Sin embargo, cabe recalcar que la tomografía computarizada es la técnica más precisa, ya que muestra el tamaño, forma y posición de cualquier tumor en el pulmón (*American Cancer Society*, 2014).

Además, se sabe que la mayoría de los pacientes presentan síntomas que son inespecíficos, es decir, los síntomas se pueden confundir con otro tipo de enfermedades como neumonías, resfríos, tos severa, etc.; por lo que el diagnóstico certero de cáncer de pulmón es generalmente tardío (Amorín Kajatt, 2013).

Así mismo el tratamiento para esta enfermedad ya sea en estadios tempranos es sumamente invasiva, lo cual requiere de tiempo y dinero, además de someter al paciente a estrés generando una disminución en su calidad de vida. Los tratamientos según las etapas del cáncer de pulmón son: etapa I: cirugía, etapa II: procedimiento quirúrgico más medicación, etapa IIIa: cirugía resectiva posterior, quimio-radioterapia en pacientes con capacidad funcional buena y respuesta

completa o enfermedad estable; etapa IIIb: quimio-radioterapia y etapa IV: quimioterapia (Amorín Kajatt, 2013)

Estudios sugieren que la pérdida de expresión de *runx3* por hipermetilación de ADN se asocia frecuentemente con la evolución del cáncer de pulmón y que la relación que existe entre la metilación de *runx3* y el cáncer de pulmón se da por tres factores. En primer lugar, la metilación de la región promotora de *runx3* se presenta frecuentemente en cánceres de pulmón primarios; y se ha visto que, la mayoría de los casos de metilación de *runx3* se dieron en etapas avanzadas de cáncer de pulmón. En segundo lugar, la metilación de *runx3* es específica del tumor, ya que no se observó en tejidos pulmonares normales. El tercer factor es la correlación de la metilación con el silenciamiento de la expresión de *runx3* (Li et al., 2004).

En Ecuador el cáncer de pulmón se diagnostica en etapas muy avanzadas mayoritariamente en los estadios 3 y 4 (Ministerio de Salud Pública, 2017). Además, los métodos de diagnóstico en Ecuador son tomografía computarizada y su respectiva confirmación con la obtención de una biopsia, este último siendo un método sumamente invasivo para el paciente, estas técnicas son empleadas de acuerdo al cuadro clínico de cada paciente, lo que contribuye que el diagnóstico se realice en etapas tardías.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Amplificar el gen *runx3* para determinar el estado de metilación del mismo y analizar las variables clínico patológicas de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la frecuencia de las variables clínico patológicas de los pacientes incluidos en este estudio.

- Amplificar el gen *runx3* mediante la técnica de PCR para determinar el estado de metilación del mismo.

1.4. Justificación

Para solucionar la problemática del diagnóstico del cáncer de pulmón de manera oportuna se ha planteado técnicas de biología molecular que son de gran relevancia en estudios contra el cáncer debido a que su objetivo es facilitar un diagnóstico prematuro incluso antes de que el cáncer se desarrolle, evitar que el pronóstico sea incierto y permitir que el paciente tenga un tratamiento con mayor eficacia. Es así que, una de las técnicas más utilizadas por la biología molecular se denominan marcadores moleculares, teniendo presente que el marcador molecular perfecto es aquel que puede ser reproducible, accesible y sobre todo confiable, teniendo siempre la capacidad de identificar de manera oportuna y temprana las células cancerosas (Amigo, Universitario, & Xeral-Cíes, 2005).

Se conoce que uno marcadores biológicos de gran significancia y con una gran cantidad de estudios en cáncer de pulmón es el gen *runx3*, debido a que su inactivación se da por mecanismos epigenéticos, específicamente por metilación de ADN, que se producen de manera habitual en distintos tipos de cáncer. Por tal motivo se ha planteado por varios investigadores a lo largo de los años el desarrollo de una técnica que permita la detección del estado de metilación de *runx3* que ayudaría a la detección de este tipo de cáncer en etapas tempranas (Ito, Bae, & Chuang, 2015).

La importancia de la investigación sobre el silenciamiento de *runx3* por metilación se basa en que este cambio epigenético en el ADN puede ser detectado en etapas iniciales del desarrollo del cáncer del pulmón o incluso antes de que el proceso tumoral inicie, debido a que se ha observado en varios estudios que cuando existe una mayor metilación del gen *runx3* el cáncer se encuentra en etapas más avanzadas. Es decir que, la pérdida de expresión de *runx3* es causada por la hipermetilación y se asocia frecuentemente con la evolución del cáncer de pulmón (Li et al., 2004).

Por tal motivo, el estudio del gen *runx3* contribuirá a realizar un estudio genético del cáncer de pulmón, permitiendo establecer el punto de partida para identificar la metilación de *runx3*, representando un pronóstico de vida para los pacientes, permitiendo el desarrollo de tratamientos específicos para cada paciente y así beneficiarse de un tratamiento personalizado y dirigido para el tipo de cáncer que padece.

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1 El cáncer

La palabra cáncer hace referencia a una enfermedad en donde las células se proliferan de manera descontrolada y anormal, debido al desequilibrio en mecanismos de muerte y proliferación celular (Weinberg, 2013). El cáncer a lo largo de los años se ha convertido en un problema de salud pública, debido que entre los efectos que presenta encontramos: la pérdida de cientos de vidas humanas además de recursos financieros en el entorno familiar como a nivel institucional (Lecuona, Guerrero & Leyva, 2015).

Diversos estudios han descrito muchos factores de riesgo y antecedentes relacionados con la aparición del cáncer, que, a pesar de no ser una causa directa, si pasan a formar parte de los indicadores de factores reales. Los agentes etiológicos son el origen directo de las transformaciones malignas y desencadenan mecanismos bioquímicos y genéticos que dan lugar al tumor; este proceso es conocido como carcinogénesis u oncogénesis (Meyers, 2007).

Además, estos agentes etiológicos permiten el desarrollo del cáncer mediante efectos carcinogénicos simultáneos en diferentes tipos de genes. En el primer tipo se encuentran aquellos que actúan directamente sobre los genes encargados de controlar la proliferación celular (denominados iniciadores) y en el segundo tipo no producen daño a los genes, sin embargo, su función es potenciar selectivamente el crecimiento de células tumorales (promotores) (Varela, 2002).

El cáncer está formado por un conjunto de enfermedades caracterizadas debido a un crecimiento celular descontrolado (tumor) y una colonización tisular

(metástasis) determinada por la acumulación de mutaciones, la primera en cierto número de casos es la hereditaria (Weinberg, 2013).

En la actualidad el cáncer es uno de los padecimientos que se presentan con mayor frecuencia y es considerado como la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. Estudios estadísticos han demostrado que el cáncer, afecta a más de un tercio de la población y causa el 20% de todos los fallecimientos y el 10% del gasto de recursos económicos de asistencia sanitaria (*International Agency for Research on Cancer, 2017*).

2.2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se produce cuando se eleva el número de células cancerosas descontroladamente en los pulmones, produciendo una masa de tejido que toma el nombre de tumor el cual puede llegar a cubrir otras partes del cuerpo; este proceso puede generar metástasis en caso de no ser detectado a tiempo. Además, este es el tipo de cáncer más frecuente y causante de la mayor mortalidad a nivel mundial en individuos de los dos géneros (Solidoro Santisteban, 2006).

La incidencia de cáncer de pulmón no micrótico va en aumento en personas que no presentan antecedentes de fumar lo que provoca una creciente preocupación (Muñoz & Pérez, 2007).

2.2.1. Tipos de cáncer de pulmón

De acuerdo a varias investigaciones se han identificado los siguientes tipos:

2.2.1.1. Cáncer de pulmón micrótico:

Es el tipo de cáncer de células pequeñas y corresponde al 10-15% del total de casos diagnosticados. Entre las características histológicas se destaca que las células epiteliales pequeñas, de forma redonda u oval con poco citoplasma, límites celulares poco definidos, cromatina nuclear granular y nucléolos imperceptibles (van Meerbeeck, Fennell, & De Ruyscher, 2011). En la microscopia electrónica se

observan gránulos de neurosecreción, por lo que los carcinomas de células pequeñas se relacionan con la producción ectópica de hormonas. Los genes relacionados a este tipo de cáncer pertenecen al grupo de oncogenes MYC, BCL2 y los genes supresores de tumores TP53, RB1, FHIT (Muñoz & Pérez, 2007).

En este tipo de cáncer de pulmón es frecuente los derrames pleurales, además los pacientes que la padecen presentan un deterioro rápido de su salud y su diagnóstico se da cuando ya se encuentra diseminado. Se han descrito dos estadios: el primero es el estadio limitado en el que las células malignas se localizan en un solo lado del pulmón, y el segundo llamado estadio extenso, en donde las células malignas se han extendido a otros lugares (Jackman & Johnson, 2005).

2.2.1.2. Cáncer de pulmón no micrótico:

Es el tipo de cáncer de células no pequeñas y el más común según la Sociedad Americana Contra el Cáncer debido a que se encuentra en el 85% de los pacientes diagnosticados (*American Cancer Society*, 2014).

De acuerdo con los estudios de Goldstraw y colaboradores en el 2011 se presentan tres subtipos de acuerdo a las diferentes células del pulmón:

I. Carcinoma de células escamosas:

Se desarrolla en células escamosas no maduras presentes en la parte interna de las vías respiratorias. A este padecimiento pertenecen el 20-30% de los casos diagnosticados y tiene relación con el tabaquismo, se ubica comúnmente en la parte media de los pulmones muy cercana al bronquio. Relacionado con el consumo de tabaco, muestra un patrón de queratinización en forma de perlas escamosas, o células independientes y eosinófilas, además de metaplasia escamosa en el epitelio bronquial adyacente. Los genes relacionados con este sub tipo son los oncogenes: EGFR, PIK3CA, IGF-1R y los genes supresores de tumores: TP53, TP63.

II. Adenocarcinoma:

Se presenta en células no maduras capaces de segregar moco. Es el subtipo que se diagnostica con mayor frecuencia. Se presenta como lesiones periféricas y pequeñas, puede presentar patrones bien diferenciados con elementos glandulares o lesiones papilares similares a otros carcinomas. Se caracteriza por presentar un patrón de crecimiento bronqueoalveolar puro, sin signos de invasión vascular, pleural ni del estroma. Los genes relacionados este sub tipo de cáncer de pulmón no micrótico son los oncogenes: EGFR, KRAS, ALK y los genes supresores de tumores: TP53, CDKN2A/B, LKB1.

III. Carcinoma de células grandes:

Se presenta en cualquier parte de los pulmones y se desarrolla con rapidez dificultando el tratamiento. Es el subtipo de menor frecuencia con el 10-15% de los casos diagnosticados. Presenta un tumor epitelial maligno poco diferenciado, células con núcleo grande y citoplasma moderado. Es un punto intermedio entre la diferenciación glandular o escamosa.

En el 2010 Ettinger y colaboradores han descrito seis estados para cáncer de células no pequeñas:

Tumor de pulmón en estadio oculto: Las células tumorales se localizan en el esputo.

Tumor de pulmón es estadio 0: Las células tumorales se encuentran en el revestimiento interno del pulmón, también llamado carcinoma *in situ* y no se reconoce como un tipo de cáncer invasivo.

Cáncer de pulmón estadio I: Las células tumorales se han extendido hacia los tejidos profundos del pulmón.

Cáncer de pulmón estadio II: Las células tumorales han invadido otros tejidos, pudiendo desarrollarse más de un tumor maligno en el lóbulo pulmonar.

Cáncer de pulmón estadio III: Las células tumorales han invadido órganos cercanos.

Cáncer de pulmón estadio IV: Los tumores se han desarrollado y se encuentran en los dos pulmones y se ha extendido a otras partes del cuerpo.

2.2.2. Adenocarcinoma de pulmón

El adenocarcinoma de pulmón es el subtipo de cáncer que se presenta en células no maduras capaces de segregar moco (células mucoproducidas). Se desarrolla mayoritariamente en fumadores y el 40% de los pacientes diagnosticados tienen este subtipo de cáncer y su expectativa de vida es mayor que la que presentan otros tipos de cáncer de pulmón (Dennis & Mary, 2013).

Travis en el 2011 clasificó al adenocarcinoma en tres tipos:

I. Adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA)

Es un tumor de predominio lepidico con un tamaño no mayor a 3 cm y componente invasivo menor a 5 mm y la supervivencia a 5 años para pacientes con este tipo de adenocarcinoma es del 100%. La mayoría de los casos no son mucinos, se presenta como un nódulo de vidrio triturado con un componente sólido que mide menos de 5 mm y el tipo mucino se observa como un nódulo sólido sin embargo es muy raro que se produzca (Travis, 2011).

II. Adenocarcinoma Invasivo

Dentro de este tipo de adenocarcinoma se encuentran cinco subtipos. El adenocarcinoma de predominio lepidico conocido como tumores mixtos, que presenta un crecimiento lepidico en el que predominan neumocitos de tipo II o también conocidos como células exocrinas bronquiales con un componente invasivo superior a 5mm. Otros subtipos incluyen el adenocarcinoma de predominio acinar, papilar, micropapilar y sólido predominante con mucina; siendo el adenocarcinoma micropapilar el último subtipo estudiado (Travis, 2011).

III. Variantes de Adenocarcinoma

Se encuentran los adenocarcinomas mucinosos invasivos que se asocian frecuentemente con la mutación KRAS, falta de factor de transcripción tiroidea 1 (TTF-1) y lesiones pulmonares multicéntricas. Histológicamente, estos tumores muestran cantidades variables de crecimiento lepidico, acinar, papilar o micropapilar consistente en células columnares con abundante mucina apical y pequeños núcleos basalmente orientados (Travis, 2011).

2.2.3. Cáncer de pulmón a nivel mundial

El cáncer de pulmón es considerado una de las principales neoplasias malignas, debido a que posee una elevada tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial y que de acuerdo con datos estadísticos presentados por la Organización Mundial de la Salud dentro el grupo de tumores malignos que presentan mayor número de muertes se encuentra el de pulmón acompañado con el de estómago, mama, hígado y colon. Es importante recalcar que este tipo de cáncer está relacionado a factores ambientales como el consumo de tabaco y que se ha determinado que alrededor del 70% de defunciones a nivel mundial son causadas por este hábito (OMS,2015).

La Agencia Internacional para la investigación en cáncer (IARC) observó que a partir del año 2002 se presentó un incremento en la incidencia de cáncer del 22% figurando que se han producido más de seis millones de muertes. Además de acuerdo con datos presentados por la Organización Mundial de la Salud en el año 2012 1 millón 590 mil personas fallecieron a causa de cáncer de pulmón, lo que significa que aproximadamente el 88% de los casos diagnosticados fallecen; al mismo tiempo se estima que para el 2020 los casos nuevos alcanzarán los 15 millones anuales (OMS, 2015). El cáncer que presenta una mayor incidencia es de pulmón, que junto con el de colon, mama y próstata pertenecen al 60% de todos los casos que se registran anualmente a nivel mundial (Solidoro Santisteban, 2006).

2.2.4. Cáncer de pulmón en Ecuador

De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer hasta el 2012 se presentaron 1.824.701 nuevos casos de cáncer de los cuales la incidencia en Ecuador fue de 1.035 casos.

Según el Registro Nacional de Tumores del Hospital de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador (SOLCA) Núcleo Quito, a nivel nacional hasta el año 2016 se reportaron 753 muertes debido a cáncer de pulmón, con 321 decesos en mujeres y 432 en hombres anualmente.

Adicionalmente se conoce que la tasa de incidencia en Quito es de 6 casos en mujeres y 7.9 en hombres por cada 10 000 habitantes; estableciendo a este cáncer como la tercera causa de muerte, mientras que el cáncer de estómago y próstata le superan en primero y segundo lugar respectivamente (Cueva, P., & Yépez, J, 2014).

2.2.5. Causas

a. Tabaquismo y fumadores pasivos

Al igual que en otras partes del cuerpo, este tipo de cáncer se produce por una acumulación de problemas genéticos en donde el epitelio bronquial se transforma en neoplasias, siendo el tabaquismo una de las principales y más conocidas causas. Es así que, el 80% de los casos están relacionados con el tiempo y cantidad de tabacos que la persona fuma, el tipo de tabaco, papel usado para la fabricación y la cantidad de aire que aspira por cada inhalación (Carcereny, 2013). Así mismo, se ha establecido que el 1,6% de todos los cánceres de pulmón están relacionados a fumadores pasivos. Estudios recientes informaron que el riesgo de padecer cáncer de pulmón se triplica si es que se presenta tabaquismo pasivo desde la infancia (Molina, Yang, Cassivi, Schild, & Adjei, 2008).

b. Alimentación

Como ya se conoce una mala alimentación combinada con una dieta rica en grasa son factores que elevan el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Lecuona,

Guerrero & Leyva, 2015). Se conoce que la ingesta de frutas y verduras que contengan una alta cantidad de compuestos como carotenoides, β -criptoxantina, licopeno, luteína, vitaminas C y E; disminuyen el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Y por el contrario se ha visto que los embutidos y los alimentos picantes están asociados al riesgo de padecer cáncer de pulmón (Molina et al., 2008).

c. Contaminación

También se debe considerar otros factores como son los factores ambientales y la contaminación atmosférica con radón en espacios no abiertos que está asociada al 6% de los casos de cáncer, al mismo tiempo de la exposición a productos que contienen los aerosoles ambientales (Lecuona, Guerrero & leyva, 2015). Además, la contaminación acumulada del aire es uno de los causales a largo plazo del cáncer de pulmón, ya que estas emisiones tienen un alto contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos. En Europa, se ha calculado que el 11% de cánceres de pulmón están relacionados con la contaminación del aire (Molina et al., 2008).

d. Exposición ocupacional

Existen ambientes laborales como en la minería y plantas nucleares donde los trabajadores están constantemente expuestos a altas dosis de elementos carcinogénicos como las radiaciones ionizantes, la sílice, cristalino, el amianto, etc. (Lecuona, Guerrero & leyva, 2015) (Molina et al., 2008).

e. Oncológicas

Otros factores influyentes son los genéticos debido a que pueden causar cambios en la estructura del ADN y provocar que las células malignas dentro de los pulmones se incrementen descontroladamente. Estas modificaciones pueden producir alteraciones en el normal funcionamiento de oncogenes o genes supresores de tumores (Carcereny, 2013). Existen un gran número de

polimorfismos genéticos estudiados en donde se ha analizado tanto su expresión como su función en relación del ADN y enzimas metabolizadoras de los carcinógenos del tabaco. Por ejemplo, se ha visto que el polimorfismo del gen *gstt1* se encuentra con mayor frecuencia en adenocarcinoma y se presenta en edades avanzadas. Polimorfismos en el exón 7 de la enzima citocromo *cyp1a1* están asociados al sexo y al hecho de ser fumador siendo un factor de riesgo para padecer cáncer de pulmón, además este polimorfismo tiene una mayor significancia en mujeres fumadoras y en pacientes que nunca han fumado. En varios estudios se ha relacionado el hábito de fumar con los polimorfismos de los genes *gstm1* y *gstp1gg*, en donde se observó que *gstp1gg* aumenta hasta dos veces el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Asimismo, investigación indican que los polimorfismos que están relacionados con la reparación del ADN pueden también estar asociados al riesgo de padecer cáncer de pulmón, estos polimorfismos se encuentran los genes *xrcc1*, *xrcc328* y *ercc2* (*asp312asn*, *lys751gln*, *arg339gln*) (Raposo, de Castro Carpeño, & Barón, 2007).

2.2.6. Epigenética y cáncer de pulmón

La epigenética estudia los cambios que se dan en la expresión genética de las células sin que haya variaciones en la secuencia de ADN (Moreno, Bruges, Arboleda, & García, 2017), estos cambios suelen ser estables sin embargo, pueden estar controlados por varios factores fisiológicos, patológicos y por el medio ambiente (Aguilera, Fernández, Muñoz, & Fraga, 2010). Además, es un proceso natural en todas las células, por lo que posee un papel esencial dentro del sistema inmune, la inactivación del cromosoma X, el desarrollo embrionario, y sobre todo en el inicio y progresión del cáncer (Moreno et al., 2017).

Las variaciones epigenéticas involucran las modificaciones covalentes de histonas, la presencia de ARN no codificante y la metilación de ADN (Moreno et al., 2017).

Estudios han demostrado que, en cáncer de pulmón, tanto al inicio como durante la progresión de la enfermedad, aparecen alteraciones tanto génicas como epigenéticas que dan origen a una desregulación de genes supresores de

tumores, oncogenes y genes relacionados con la reparación del ADN. A pesar que las alteraciones genéticas somáticas desempeñan un papel importante en la oncogénesis, se ha establecido que en el cáncer de pulmón las alteraciones epigenéticas son mucho más frecuentes que las mutaciones somáticas (Moreno et al., 2017).

2.2.7. Diagnóstico

Se lleva a cabo en primera instancia con una exploración física minuciosa y de la anamnesis del paciente, con la finalidad de analizar los factores de riesgo que presente para establecer en que estadio se encuentra la enfermedad, para ello se realiza estudios por imagen acompañado de una biopsia del tejido (Delbrück, 2002).

I. Estudio por imagen

La radiografía de tórax es la primera prueba que realiza con el fin de encontrar alguna masa anormal o manchas que pueden ser tumores dentro de los pulmones (Dennis & Mary, 2013).

La tomografía computarizada es de utilidad para establecer el daño en la estructura del pulmón y el estado en el que se encuentra la enfermedad (Lecuona, Guerrero & leyva, 2015).

Cuando se realiza un contraste marcando otros órganos se observa una especificidad del 70% y sensibilidad del 80% para detección de nódulos. La resonancia magnética es utilizada para evaluar diseminación al cerebro y médula espinal (mayoritariamente en carcinoma de células pequeñas) (Dennis & Mary, 2013).

II. Biopsia de tejido

Se usa para confirmar el diagnóstico del estudio por imagen y depende del estado general de salud de cada paciente.

La citología del esputo presenta una sensibilidad del 66% y especificidad del 99% en pacientes asintomáticos. Este procedimiento es mínimamente invasivo debido a que no se requiere de una incisión quirúrgica, su sensibilidad es del 95-97% y una especificidad del 90-100% (GarcíaConde, 2000).

La broncoscopia es utilizada para establecer la localización del tumor o alguna obstrucción en las vías respiratorias, presentando una efectividad del 90-94% cuando la lesión del paciente se encuentra en la región central del pulmón. La toracocentesis que es el procedimiento en el cual se realiza una punción quirúrgica en la pared torácica con la finalidad de drenar el líquido que se ha acumulado en la cavidad pleural (Orsini, 2000), este procedimiento es usado en pacientes con derrame pleural con el fin de establecer si dicho derrame se produjo por la propagación del cáncer (Lecuona, Guerrero & leyva, 2015).

En la Tabla 1 se describe las características del tipo de tumor primario de acuerdo al estadio de la enfermedad, además del porcentaje de supervivencia a 5 años de cada uno.

Tabla 1.

Descripción y tiempo de supervivencia de cada estadio de la enfermedad de acuerdo al sistema TNM del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer para estadificación del carcinoma de células no pequeñas.

ESTADIO	TIPO DE PULMÓN PRIMARIO	DESCRIPCIÓN	SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS
IA	T1a	Sin ganglios linfáticos comprometidos y ausencia de metástasis a distancia	73%
	T1b		
IB	T2a	Sin ganglios linfáticos regionales comprometidos y ausencia de metástasis a distancia	58%

IIA	T1a	Metástasis ganglionares peribronquiales o hiliares	46%
	T2a	homolaterales sin metástasis a distancia	
	T2b	Sin ganglios linfáticos comprometidos y sin metástasis a distancia	
IIB	T2a	Metástasis ganglionares peribronquiales o hiliares homolaterales sin metástasis a distancia	36%
	T2b	Sin ganglios linfáticos regionales comprometidos y sin metástasis a distancia	
	T1a	Metástasis ganglionares mediastínicas sin metástasis a distancia	
IIIA	T2	Sin ganglios linfáticos regionales comprometidos y con metástasis ganglionares peribronquiales o hiliares homolaterales sin metástasis a distancia	24%
	T3	Metástasis ganglionares peribronquiales o hiliares homolaterales sin metástasis a distancia	
	T4	Sin ganglios linfáticos regionales comprometidos y con metástasis ganglionares peribronquiales o hiliares homolaterales sin metástasis a distancia	
	T1a – T4	Metástasis ganglionares mediastínicas con ausencia de metástasis a distancia	
IIIB	T1a – T4	Metástasis ganglionares mediastínicas con ausencia de metástasis a distancia	9%

IV	Cualquier tumor primario y nódulos o ganglios linfáticos regionales	Metástasis a distancia	13%
-----------	--	------------------------	-----

Tomado de (García-Conde, J., 2000)

2.3. Factores de transcripción Runx

Los factores de transcripción Runx poseen dominios funcionales conservados, tales como la señal de localización nuclear y subnuclear; dominios de represión transcripcional, dominios de transactivación y un dominio ácido altamente conservado (RHD) que consta de 100-120 aminoácidos y representa un 93% de su identidad (León, s.f.).

En los mamíferos existen tres genes que codifican las proteínas que pertenecen a la familia de factores de transcripción, estos son *aml* (Leucemia mieloide aguda), *cbfb* (Factor de unión al núcleo) y *pebp2* (Proteína de unión a potenciador de poliomavirus) (León, s.f.).

Mediante la unión de las proteínas Runx al ADN, y las interacciones de las proteínas con *cbfb*; la sección C terminal de la molécula Runx regula los procesos de transcripción. Los sitios en donde se da la unión al ADN se encuentran dentro de las regiones promotoras y reguladoras de algunos genes específicos de diferenciación estructuras óseas y hematopoyesis (Bangsow et al., others, 2001).

2.3.1. Miembros de la familia Runx

En el ser humano existen tres genes relacionados con los factores de transcripción:

1. *runx1*: es indispensable para funciones de hematopoyesis y está directamente relacionado con las translocaciones cromosómicas que ocurren en pacientes con leucemia aguda (al menos en el 30% de casos).
2. *runx2*: forma parte de las funciones de osteogénesis y se puede encontrar como mutación en los casos de displasia cleidocraneal.

3. *runx3*: participa como supresor de la apoptosis celular y tumoral.

(de México, 2002)

2.3.2. Gen *runx3*

El gen *runx3* fue identificado por primera vez en el año 1994 por Levanon y colaboradores, y la denominaron como la subunidad 3 del factor de unión al núcleo, inicialmente *runx3* fue reportado como un supresor tumoral (Shiraha, Nishina, & Yamamoto, 2011). De los tres miembros de la familia de genes *runx*, *runx3* es el más pequeño con 67 kb y seis exones (Ito, 2004), pero también es el gen menos investigado (Bangsow et al., others, 2001).

runx3 posee su dominio runt, ubicado en el gen *Drosophila Runt*, debido a su compleja estructura genómica y su directa participación en el desarrollo de neuronas monosinápticas primitivas, se estableció que *runx3* es el gen más antiguo de la familia (Ito, 2004)

Se localiza dentro del cromosoma 1p36, esta región cromosómica se deleciona en varios tipos de cáncer y está directamente relacionado con la tumorigénesis y como supresor tumoral en cáncer de estómago, vejiga, mama y pulmón. (Nakanishi et al., others, 2011). Generalmente las funciones de *runx3* como supresor tumoral suelen ser interrumpidas por la hipermetilación del ADN (Lee et al., 2013). Así mismo, estudios han demostrado que en células en donde la expresión de *runx3* se ve disminuida, existe una pérdida de heterocigosidad ocasionada por la hipermetilación que ocurre en la región promotora del gen (de México, 2002).

Además de funcionar como factor de transcripción, *runx3* es el encargado de regular la expresión génica de varios genes mediante la formación de un complejo con Smads (transductor de señalización de TGF- β). TGF- β activa los transductores de señal denominados R-Smad, que a su vez se asocian con Smad4 para ingresar al núcleo, en donde el complejo R-Smad/ Smad4 /Smad3 se une con los factores de transcripción para regular la transcripción de genes diana.

A continuación en la Figura 1, se explican algunos de los efectos que posee *runx3* a partir de la interacción aguas abajo de TGF- β y el complejo de Smads, proporcionando una posible explicación del papel que desempeña *runx3* dentro del proceso de tumorigénesis en células sanas (Chen, Liu, Bai, Pei, & Zheng, 2016) (Chuang & Ito, 2010)

- *runx3* inhibe el crecimiento de células epiteliales induciendo la expresión del gen p21 en respuesta a TGF- β .
- Mediante la activación del gen *bim*, *runx3* actúa para inducir la apoptosis cuando se expone a TGF- β .
- *runx3* posee tres sitios de unión con el promotor del factor de crecimiento endotelial vascular (Vegf), inhibiendo la angiogénesis de células cancerígenas. Esto indica que *runx3* reprime la transición epitelio mesénquima (Emt); proceso en donde se inhibe la transcripción de genes que codifican las uniones adherentes, estrechas y la célula pierde la polaridad apico-basal.

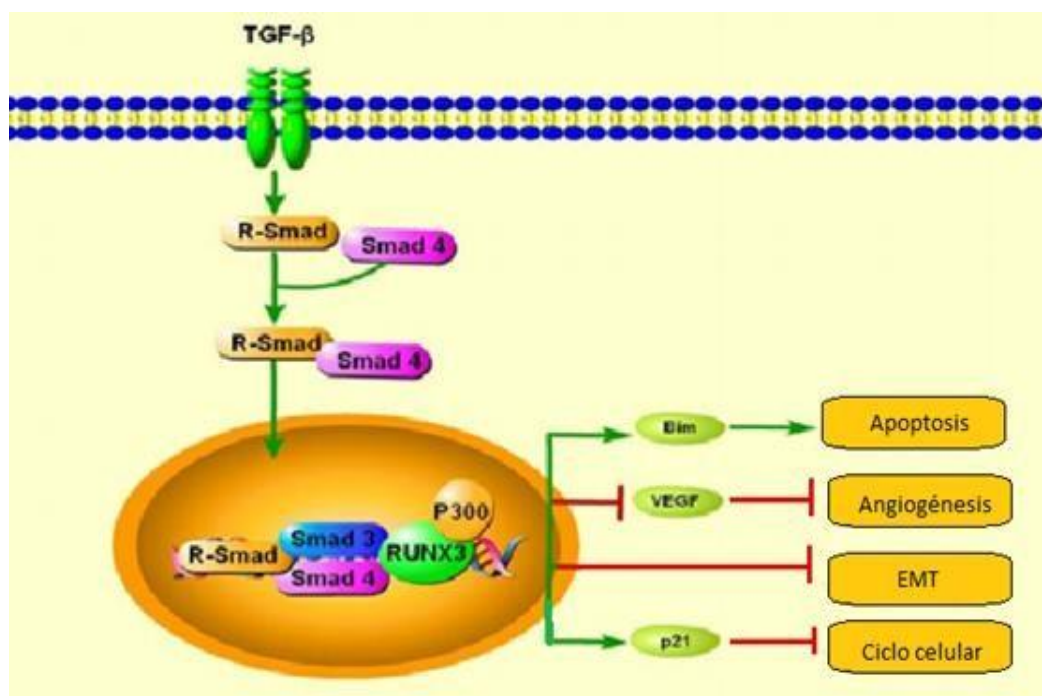


Figura 1. Los efectos pleiotrópicos de Runx3 durante la supresión de la metástasis tumoral en la vía de señalización de TGF- β .

Adaptado de (Chen et al., 2016)

Para contrastar se observa en la Figura 2, algunos de los efectos que posee *runx3* a partir de la interacción aguas abajo de TGF- β y el complejo de Smads, cuando este se encuentra inactivado en células enfermas (Chen et al., 2016).

- *runx3* induce el crecimiento de células epiteliales inhibiendo la expresión del gen p21 en respuesta a TGF- β .
- Al estar *runx3* inactiva se inactiva también el gen *bim*, inhibiendo la apoptosis cuando se expone a TGF- β .
- Sin la presencia de *runx3* se induce el gen *Vegf*, lo que provoca la angiogénesis de células cancerígenas.

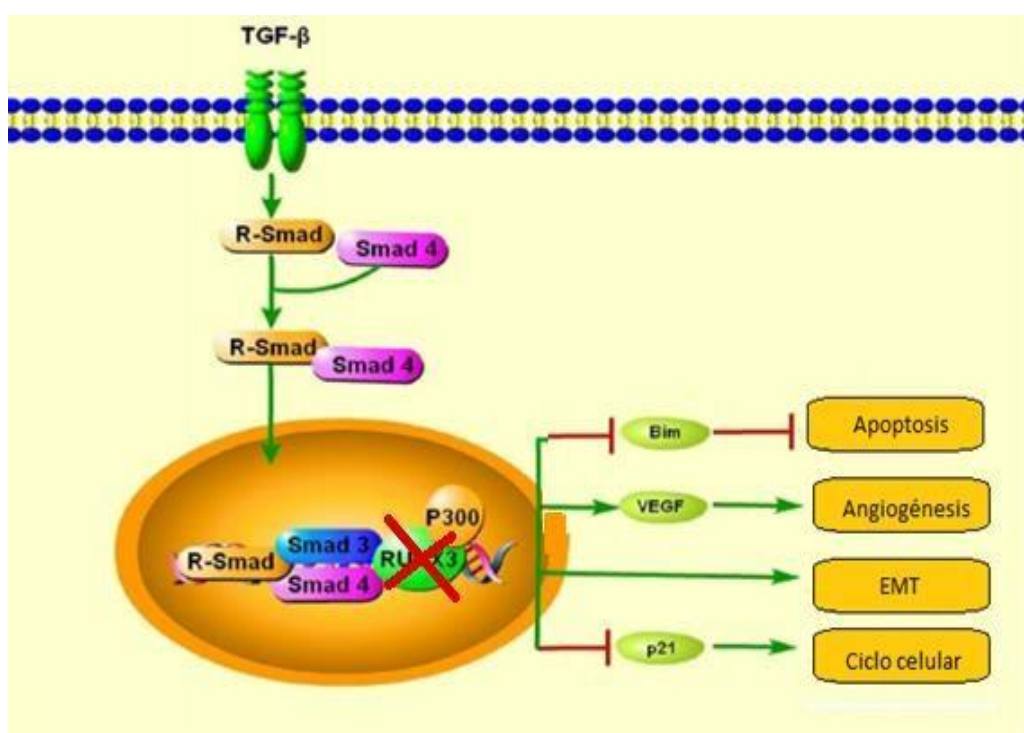


Figura 2. Los efectos pleiotrópicos de Runx3 durante su inactivación en la supresión de la metástasis tumoral en la vía de señalización de TGF- β .

Adaptado (Chen et al., 2016)

2.3.3. *runx3* y su relación con distintos tipos de cáncer

El gen *runx3* está directamente relacionado con los distintos tipos de cáncer debido a que presenta modificaciones afines a varios carcinomas, dichas alteraciones son genéticas como mutaciones y epigenéticas como la metilación

(Yanagawa et al., 2011). Sin embargo, no está clara la causa por la cual el gen *runx3* produce esta metilación aberrante (Zuo et al., 2013).

La inactivación de *runx3* por hipermetilación se ha evidenciado en varios tipos de tejidos como: tejido gástrico, vejiga, colorrectal, mama, pulmón, pancreático, cánceres cerebrales y carcinoma hepatocelular (Chuang & Ito, 2010).

En estudios realizados por Li y colaboradores en el año 2004 se ha visto que la expresión del gen *runx3* está reducida en un 45% a 60% en pacientes que presentan cáncer de pulmón, y a su vez esta baja expresividad se asocia significativamente con la disminución de la supervivencia (Shiraha et al., 2011).

Además, estudios han demostrado que la metilación de *runx3* no solo se da en fases tempranas de la tumorigénesis, sino que también aumenta con la edad, por lo tanto, *runx3* puede ser usado en la detección y pronóstico del cáncer. Así mismo, Sakakura y colaboradores en el 2007, establecieron que la inactivación de *runx3* está relacionada con resistencia a la radiación y el mal pronóstico (Chuang & Ito, 2010).

runx3 se silencia a consecuencia de otro mecanismo epigenético que es la metilación de histonas, proceso que a veces es mediado por el oncogén *ezh2*. *ezh2* pertenece al complejo represor Polycomb 2, el cual actúa en la pluripotencia de células madre y la autorenovación. En *runx3* se metila la histona H3 en el residuo Lys27 (H3K27) para inhibir la transcripción. *ezh2* dirige la metilación del ADN mediante el llamado de DNA metiltransferasas hacia los promotores de *runx3* (Chuang & Ito, 2010).

También se ha visto que la sobreexpresión *ezh2* en tumores agresivos es causada por la pérdida de su regulador microRNA-101, reduciendo la metilación de H3K27 y aumentando los niveles de ARNm de *runx3*. Igualmente, Fujii y colaboradores en el 2008 hallaron que *ezh2* se une al promotor *runx3*, lo cual origina que la regulación metilación de H3K27 sea positiva (Chuang & Ito, 2010).

Recientemente, se ha demostrado que la regulación inducida por hipoxia de la histona G9a metiltransferasa y la expresión de la histona diacetilasa 1 (HDAC1) también causan un silenciamiento epigenético de *runx3* a través de la metilación

de la histona H3K9 y la disminución de la acetilación de H3 en el promotor *runx3*. Se conoce que la hipoxia está asociada a tumores sólidos de $\geq 1\text{mm}^3$, lo que apunta a que la inactivación de *runx3* puede estar ligada al aumento del tamaño del tumor (Chuang & Ito, 2010).

En cáncer gástrico, se ha establecido que *Helicobacter pylori* es uno de los principales factores de riesgo y que además también influye en el estado de metilación de *runx3* mediante la producción de óxido nítrico, lipopolisacáridos o por inflamación (Chuang & Ito, 2010).

En cáncer de mama, una de las principales causas de la enfermedad es la exposición a estrógenos ya que induce a las células epiteliales derivadas de las células madre aisladas de tejidos mamarios sanos sufran transformaciones neoplásicas. La exposición de estas células al estrógeno fue suficiente para inducir la hipermetilación de *runx3* (Chuang & Ito, 2010).

2.4. Metilación de Runx3 y su relación con el adenocarcinoma de pulmón.

La metilación es un evento epigenético que generalmente se da en genes supresores de tumores, los cuales suelen estar encargados de funciones como el ciclo celular, movilidad, proliferación, reparación del ADN y la apoptosis (Rojas Moreno, Bruges, Cañas Arboleda, & Jaramillo, 2016).

Siendo *runx3* un gen supresor de tumores, se ha establecido que su inactivación por metilación en cáncer de pulmón se da en etapas tempranas de la enfermedad debido a que el gen ya presenta metilación cuando recién existe una hiperplasia adenomatosa atípica que es una lesión premaligna (Ito et al., 2015), así mismo que el nivel de metilación del gen está relacionado con los distintos estadios del cáncer de pulmón (Moreno et al., 2017).

Como ya se explicó anteriormente el silenciamiento de *runx3* puede deberse a la regulación de varios genes en distintos procesos, uno de ellos es la modificación de histonas mediado por el gen *ezh2*.

Otro evento por el cual se puede dar la inactivación de *runx3* se debe a la inducción de los genes *k-ras*, *arf* y *p21* que poseen funciones muy importantes dentro de la defensa celular contra la agresión oncogénica, este suceso está mediado por *p53*, ambos genes son objetivos de *runx3*. La activación transcripcional de *arf* es fundamental para la estabilización oncogénica inducida por *k-ras* de *p53*, que cumple un papel importante en la supresión tumoral. Así mismo, *p21*, que se induce tanto en forma dependiente como independiente de *p53*, también desempeña un papel fundamental en la defensa frente a los oncogenes K-Ras. Lee y colaboradores en un estudio realizado en el 2010 observaron que la inducción de *arf* y *p21* dependía tanto de la actividad de *k-ras* como de *runx3* (Chen et al., 2016).

3. Capítulo III. Diseño del plan experimental

El desarrollo del presente proyecto fue dirigido por la M.Sc. Yanara Astudillo, en el laboratorio de docencia de Biología Molecular de la Universidad Tecnológica Equinoccial y Laboratorio Multidisciplinario de Ciencias Biológicas y Químicas de la Universidad de las Américas, y se efectuó en tres etapas mismas que se detallan en la Figura 3.

La primera etapa del proyecto se realizó en las instalaciones del Hospital Carlos Andrade Marín de Quito y consistió en la obtención de los datos clínicos relevantes y las muestras de tejido embebido en parafina de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón, procedimiento que se llevó a cabo en la Unidad de Anatomía patológica. Estas muestras fueron microdisectadas por el personal.

La segunda etapa empezó con la extracción de ADN de las muestras, la cuantificación del ADN, el tratamiento con bisulfito, la amplificación del gen *runx3* y finalmente la visualización de los productos de la PCR mediante un gel de agarosa.

En la etapa tres se realizó el análisis de los resultados obtenidos de las fases anteriormente detalladas, en donde se utilizaron 45 muestras.

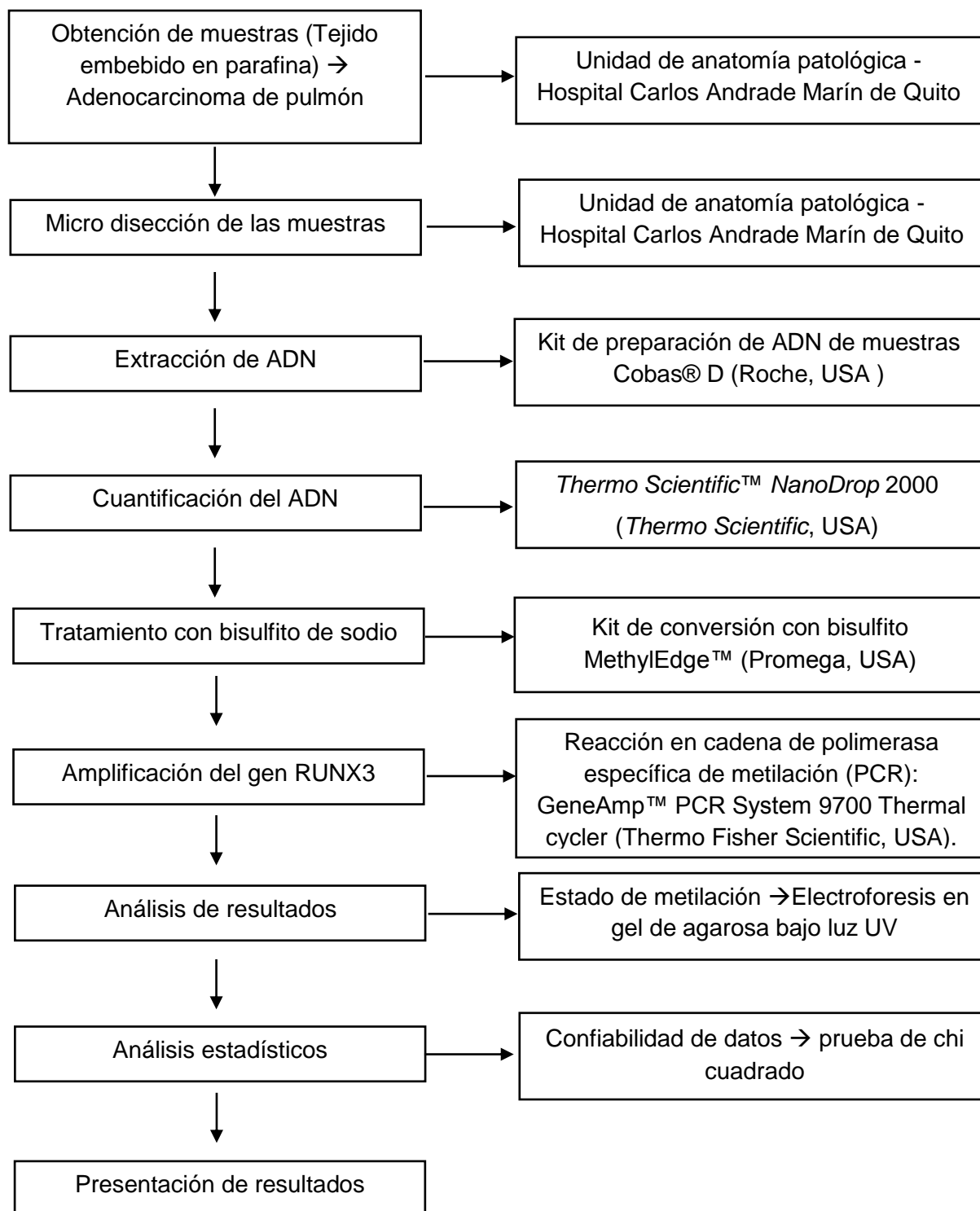


Figura 3. Diagrama del proceso a realizarse para la amplificación del gen runx3 en pacientes que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito.

Nota: Se detalla el proceso a realizarse y se especifica el lugar y las herramientas más importantes a ser usada en cada paso de la parte experimental del proyecto.

4. Capítulo IV. Procedimientos

4.1. Población y muestra

A pesar de que el presente estudio es un estudio no probabilístico observacional, se determinó que la población para este estudio es de 50 pacientes que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón durante el año 2016 en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito. Mediante el uso del software libre estadístico OpenEpi (Dean, Sullivan, & Soe, 2013) el cual utiliza la fórmula:

$$n = \frac{[EDFF \times Np(1-p)]}{[(d/2/Z_{1-\alpha/2} \times (N-1) + p \times (1-p))]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde:

n= tamaño de muestra

EDFF= efecto diseño

N= tamaño población

p= proporción estimada

q= 1 – p

d= precisión absoluta deseada

Se determinó que el tamaño de la muestra con el 95% de confianza eran 45 pacientes, como se observa en la Tabla 2.

Para el estudio se cuenta con todos los permisos pertinentes tanto en el Hospital Carlos Andrade Marín, como del Comité de Bioética de la Universidad de las Américas (Ver Anexo 1).

Tabla 2.

Tamaño de la muestra para la amplificación del gen runx3 mediante una PCR específica de metilación de acuerdo al 95% de confianza con el uso del software libre estadístico OpenEpi.

Intervalo de confianza (%)	Tamaño de la muestra
80%	39
90%	43
95%	45
97%	46
99%	47
99.9%	48
99.99%	49

4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1. Obtención de datos

La información sobre el paciente se obtuvo de la base de datos de la unidad de anatomía patológica, y fueron comprobados con la historia clínica de cada paciente mediante el software AS400 del hospital.

Los datos que se tomaron en cuenta para el análisis fueron: sexo, edad, historial de tabaquismo y las observaciones del médico tratante en donde se determina el diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón.

4.2.2. Obtención de muestras

Las muestras de tejido tumoral de pulmón, pleura y bronquios embebidas en parafina se obtuvieron de la unidad de anatomía patológica del Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, las cuales se localizan dentro de un archivo exclusivo de

la unidad, almacenadas a temperatura ambiente. Se realizaron 10 cortes de 3um para cada una de las muestras por parte del personal de la unidad de anatomía patológica del hospital con el uso del micrótopo Thermo Shandon Finesse ME (USA) como se observa en el Anexo1. Cabe mencionar que no se señaló la zona específica del tumor, es decir, que la muestra obtenido pertenece a todo el tejido contenido en el bloque.

4.2.3. Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN con el kit cobas® *DNA Sample Prep Kit* (Roche, USA), el cual es específico para muestras embebidas en parafina. Se realizó una desparafinización previa de las muestras con xilol y etanol absoluto para después proceder con la extracción de ADN de acuerdo a las indicaciones establecidas en el protocolo.

1. Se colocó la muestra de tejido en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y se añadió 500 µL de xileno, se mezcló con la ayuda de un vórtex por 10 segundos.
2. Se dejó reposar por 5 minutos a una temperatura entre 15 –30 °C.
3. Se añadieron 500 µL de etanol absoluto y se mezcló con la ayuda de un vórtex por 10 segundos.
4. Se dejó reposar por 5 minutos a una temperatura entre 15 – 30 °C.
5. Se centrifugó a 16.000 x g a 20.000 x g por 2 minutos y se descartó el sobrenadante.
6. Se añadió 1 mL de etanol absoluto y se mezcló con la ayuda de un vórtex por 10 segundos.
7. Se centrifugó a 16.000 x g a 20.000 x g por 2 minutos y se descartó el sobrenadante.
8. Se dejó secar el pellet por 10 minutos en baño maría a una temperatura de 56 °C con la tapa del tubo abierta.
9. Se resuspendió el pellet tejido con 180 µL de buffer de lisis de tejido (DNA TLB).

10. Se añadieron 70 μL de PK Y se procedió a mezclar con vórtex por 30 segundos, verificando que el tejido se haya dissociado por completo en la mezcla.
11. Se incubaron los tubos a 56 °C por una hora en baño maría.
12. Se elevó la temperatura del baño maría a 90 °C durante una hora, tiempo durante el cual se procedió a preparar los consumibles para la etapa final de la extracción (1 tubo de filtrado, 3 tubos colectores y 1 tubo de microcentrífuga de 1.5 mL)
13. Se retiraron los tubos del baño maría y se dejó enfriar a temperatura entre 15 – 30 °C, se pulso la centrifuga un par de segunda con la finalidad de recolectar la mezcla de la tapa y alrededores del tubo.
14. Se añadieron 200 μL de buffer de unión (DNA PBB) y se mezcló por pipeteo 3 veces. Asegurándonos que la solución sea homogénea.
15. Se incubaron los tubos de 15 a 30 °C por 10 minutos.
16. Se añadieron 100 μL de isopropanol y se mezcló el lisado por pipeteo 3 veces.
17. Se transfirió el lisado (\approx 550 μL) dentro del tubo de filtrado con un tubo colector.
18. Se centrifugó a 8000 x g por 1 minuto.
19. Se colocó el tubo de filtrado en un nuevo tubo colector. Se descartó el líquido del antiguo tubo colector en el recipiente de desechos químicos.
20. Se añadieron 500 μL del buffer de lavado 1 (*Wash Buffer 1*) en el tubo de filtrado con el tubo colector.
21. Se centrifugó a 8000 x g por 1 minuto.
22. No se descartó el tubo colector, solo se descartó el líquido en el recipiente de desechos químicos. Se colocó el tubo de filtrado de nuevo en el mismo tubo colector.
23. Se añadieron 500 μL del buffer de lavado 2 (*Wash Buffer 2*) en el tubo de filtrado con el tubo colector.
24. Se centrifugó a 8000 x g por 1 minuto.

25. Se colocó el tubo de filtrado en un tubo de elución previamente rotulado. Se descartó el líquido del tubo colector en el recipiente de desechos químicos.
26. Se añadieron 100 μ L del buffer de elución (DNA EB) en el centro de la membrana del tubo de filtrado sin tocar la membrana.
27. Se incubó el tubo de filtrado con el tubo de elución de 15 a 30 °C por 5 minutos.
28. Se centrifugó a 8000 x g por 1 minuto para recoger el eluido en el tubo de elución (tubo de microcentrífuga de 1.5 ml previamente etiquetado). Se desechó correctamente el tubo de filtrado, y se obtuvo el eluido que fue el stock de ADN.
29. Al finalizar se procedió a la cuantificación del ADN.

4.2.4. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó mediante el uso del equipo *Thermo Scientific™ NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific, USA*). Se utilizó como blanco 2 μ L de buffer de elución del kit utilizado en la extracción de ADN; y posteriormente se añadieron 2 μ L de cada muestra y se procedió a medir la concentración.

La cuantificación de ácidos nucleicos se basa en la espectrofotometría para determinar la pureza del ADN mediante la relación de absorbancia 260/280 nm, para lo cual se estableció que el rango de 1.7 y 2.1 fue la óptima (Concepción J. Puerta B. y Claudia P. Ureña P., 2005).

4.2.5. Conversión de ADN con bisulfito de sodio

Antes de realizar la PCR específica de metilación se aplicó un tratamiento con bisulfito de sodio a cada una de las muestras.

Se utilizó el kit *MethylEdge® Bisulfite Conversion System* (*Promega, USA*) y se siguió las indicaciones establecidas en el kit y detalladas a continuación:

Para la conversión con bisulfito se procedió de la siguiente manera:

1. Se colocaron 20µl de cada muestra de ADN en un tubo de PCR de 200µl.
2. Se agregaron 130µl de reactivo de conversión *Bisulfite* ME a cada muestra de ADN y se pipeteo suavemente para mezclar.
3. Se centrifugó brevemente para recoger la muestra en el parte inferior del tubo.
4. Se incubó la reacción de la siguiente manera:

8 minutos a 98 ° C

60 minutos a 54 ° C

Mantener a 4 ° C

Para la desulfonación y limpieza de ADN:

5. Se agregaron 600µl de tampón de unión ME a la columna ME *Spin* y se transfirió toda la muestra tratada con bisulfito a la columna.
6. Se mezcló invirtiendo el tubo varias veces.
7. Se centrifugó a velocidad máxima ($\geq 10,000 \times g$) durante 30 segundos.
8. Se descartó el sobrenadante y se insertó la columna ME *Spin* en el mismo tubo de colección.
9. Se añadieron 100µl de tampón de lavado 1X ME (con etanol añadido).
10. Se centrifugó a máxima velocidad ($\geq 10,000 \times g$) por 30 segundos.
11. Se añadieron 200µl de tampón de desulfonación ME a cada columna de centrifugación ME.
12. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
13. Se centrifugó a velocidad máxima ($\geq 10,000 \times g$) por 30 segundos.
14. Se añadieron 200µl de ME *Wash Buffer* (etanol añadido)
15. Se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos. Se repitió este paso de lavado una vez más.
16. Se colocó la columna ME *Spin* en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

17. Se añadieron 10µl de ME *Elution Buffer*.
18. Se centrifugó a la velocidad máxima ($\geq 10,000 \times g$) por 30 segundos.
19. Las muestras se almacenaron a 4 ° C para ser usadas en la PCR.

4.2.6. PCR específica de metilación

Los primers utilizados para la PCR específica de metilación se obtuvieron del estudio de Li y colaboradores en el 2004 (Li et al., 2004) y se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Primers metilados y no metilados utilizados para la amplificación del gen runx3 mediante la PCR específica de metilación.

PRIMER	FORWARD	REVERSE
Runx3 metilado	50-TTA CGA GGG GCG GTC GTACGC GGG-30	50-AAA ACG ACC GAC GCG AACGCC TCC-30
Runx3 no metilado	50-TTA TGA GGG GTG GTT GTA TGT GGG-30	50-AAA ACA ACC AAC ACA AAC ACCTCC-30

Tomado de (Li et al., 2004)

Los primers liofilizados se reconstituyeron en agua grado biología molecular de acuerdo a las indicaciones establecidas por la casa comercial.

La PCR específica de metilación se realizó con *GeneAmp™ PCR System 9700 Thermal cycler* (Thermo Fisher Scientific, USA) y las concentraciones y volúmenes empleados se detallan a continuación en las Tablas 4 y 6 la PCR específica de metilación con primers metilados; y en las Tablas 5 y 7 la PCR específica de metilación con primers no metilados.

Tabla 4.

Concentración de reactivos y volumen final para la amplificación del gen runx3 usados en la PCR específica de metilación con primers metilados.

Reacción de PCR	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1Rx (µL)
Go taq Green			
Mater Mix	2x	1x	13 µL
Primer forward	10 µM	0.18 µM	0,5 µL
Primer Reverse	10 µM	0.18 µM	0,5 µL
ADN	-	≤250 ng	3 µL
MgCl₂	50 mM	3.7 mM	2 µL
Agua	-	-	8 µL
Volumen total			27 µL

Tabla 5.

Concentración de reactivos y volumen final para la amplificación del gen runx3 usados en la PCR específica de metilación con primers no metilados.

Reacción de PCR	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
Go taq Green			
Mater Mix	2x	1x	13 µL
Primer forward	10 µM	0.18 µM	0,5 µL
Primer Reverse	10 µM	0.18 µM	0,5 µL
ADN	-	≤250 ng	3 µL
MgCl₂	50 mM	3.7 mM	2 µL
Agua	-	-	8 µL
Volumen total			27 µL

Tabla 6.

Condiciones establecidas en el termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 para la amplificación del gen *runx3* usadas para la PCR específica de metilación con primers metilados.

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	50 s.	
Hibridación	72°C	1 min. 50 s.	30 ciclos
Extensión	72°C	2 min.	
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo
Finalización	4°C		∞

Tabla 7.

Condiciones establecidas en el termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 para la amplificación del gen *runx3* usadas para la PCR específica de metilación con primers no metilados.

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min.	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	50 s.	
Hibridación	60°C	1 min. 50 s.	30 ciclos
Extensión	72°C	2 min.	
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo
Finalización	4°C		∞

4.2.7. Electroforesis en gel de agarosa

Con los fragmentos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% p/v en todos los casos, con el procedimiento detallado a continuación:

1. Se preparó el gel de agarosa al 1.5% p/v en buffer TBE 0.5x para lo cual se pesó 1.5 gr de agarosa UltraPure™ Agarose grado biología molecular (Invitrogen, USA)
2. Se hidrato la agarosa en una plancha con agitación durante 5 minutos.
3. Se fundió la agarosa en microondas durante 2 minutos hasta que se observó completamente transparente.
4. Se procedió a enfriar en la plancha con agitación hasta llegar a la temperatura de 60 ° C.
5. Se colocó 1 µL de SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) por cada 100 mL de gel y se agitó hasta homogenizar la solución.
6. Se armó la cámara de electroforesis y se dispensó la solución con las respectivas peinetas en el extremo superior, se cubrió de la luz y se dejó solidificar.
7. Una vez que se solidificó el gel se procedió a retirar las peinetas y se introdujo a la cámara de electroforesis horizontal y se añadió buffer TBE 1X hasta cubrir por completo el gel.
8. Se cargó en el primer pocillo el marcador de peso de 100pb. (Thermo Scientific, USA) GeneRuler 100 bp. DNA Ladder, seguido de 10 uL las muestras en los pocillos siguientes.
9. Se corrió el gel por 40 minutos a 120 V y se observó en el fotodocumentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad.

Como resultado de la metilación del gen se esperaba la visualización de una banda específica en el gel de agarosa por cada muestra según sea su estado de metilación, es decir, si el gen se encuentra metilado en dicha muestra amplificará para el par de primers metilados y si el gen no se encuentra metilado en la muestra amplificará para el par de primers no metilados. Para esto el kit de conversión de bisulfito actúa de manera que, las citosinas no metiladas

reaccionan con bisulfito y se convierten en uracilos, mientras tanto las citosinas metiladas no se ven afectadas.

Esto permite la determinación específica de secuencia de metilación, es decir, las citosinas metiladas pueden detectarse después de la conversión de bisulfito mediante la PCR específica (Promega, USA).

4.3. Evaluación estadística de los resultados

Para el análisis estadístico de la población estudiada se realizarán análisis descriptivos mediante la determinación de las frecuencias a partir de las variables clínico patologías además del uso de pasteles para una mejor visualización de los resultados. Se tomó en cuenta los siguientes parámetros detallados en la Tabla 8 de operacionalización de las variables.

Al mismo tiempo, se realizó la prueba de independencia de chi cuadrado χ^2 donde se analizó la relación entre la variable estadio de la enfermedad con las variables sexo, edad y condición de fumador.

Para esto establecimos la hipótesis nula y la hipótesis alternativa. Si el valor de chi cuadrado es menor a el valor p (0.05) se aceptó la hipótesis nula caso contrario se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa.

Ho: independencia de las variables

H1: relación entre las variables

Tabla 8.

Tabla de operacionalización de variables en estudio, sus valores de referencia y el tipo de variable.

Variable	Definición	Indicadores	Valores	Tipo de variable
Edad	Tiempo que ha vivido una persona contando desde su nacimiento	Número de años que ha vivido el paciente	26 – 45 46 – 65 66 – 85	Cuantitativa intervalo
Sexo	Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer.	Pertenece al género masculino	Masculino Femenino	Nominal
Estadio de la enfermedad	Se refiere a la extensión de su cáncer, es decir, qué tan grande es el tumor y si se ha extendido.	Progresión a la malignidad de la enfermedad	Estadio I Estadio II Estadio III Estadio IV	Ordinal
Condición de fumador	Persona que presenta antecedentes de haber fumado al menos un cigarrillo al día, respira el humo de tabaco a lo largo de su vida.	Si ha fumado o no	Si No	Cualitativa dicotómica

5. Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis estadístico de las variables clínico patológicas de los pacientes incluidos en el estudio

Los datos recopilados de los 45 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito en el año 2016, se resumen en el Anexo 1. A partir de dichos datos se obtuvieron los resultados detallados en la Tabla 9 y Figura 4, en donde, se aprecia que de las 45 muestras incluidas en el estudio el 55,6% pertenecieron al sexo femenino, es decir, 25 pacientes y el 44,4% al sexo masculino lo que corresponde a 20 pacientes; estos valores indican que la población ecuatoriana no concuerda con los datos presentados por la Sociedad Americana del Cáncer, en donde establecen que el tipo de cáncer adenocarcinoma se presenta con mayor frecuencia en hombres (*American Cancer Society*, 2014).

A pesar de esto, cabe recalcar que en Ecuador de acuerdo a los datos presentados por el Registro Nacional de Tumores de SOLCA Núcleo de Quito, se ha observado un aumento en el número de pacientes femeninas diagnosticadas con cáncer de pulmón, a diferencia de países desarrollados en donde se ha observado en los últimos diez años un decrecimiento de pacientes tanto masculinos como femeninos diagnosticados con este tipo de cáncer (Cueva, P., & Yépez, J., 2014).

Por otro lado, se podría pensar que los resultados obtenidos fueron producto de que el n muestral establecido para el estudio no representa a la población de pacientes con adenocarcinoma de pulmón en el Ecuador, es decir, que el tamaño de la muestra no es lo suficientemente grande como para considerarse una muestra representativa debido a que es un estudio inicial y en retrospectiva de este grupo de pacientes (Martínez, 2012).

Tabla 9.

Frecuencia de pacientes de acuerdo al sexo tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	25	55.6
Masculino	20	44.4
Total	45	100

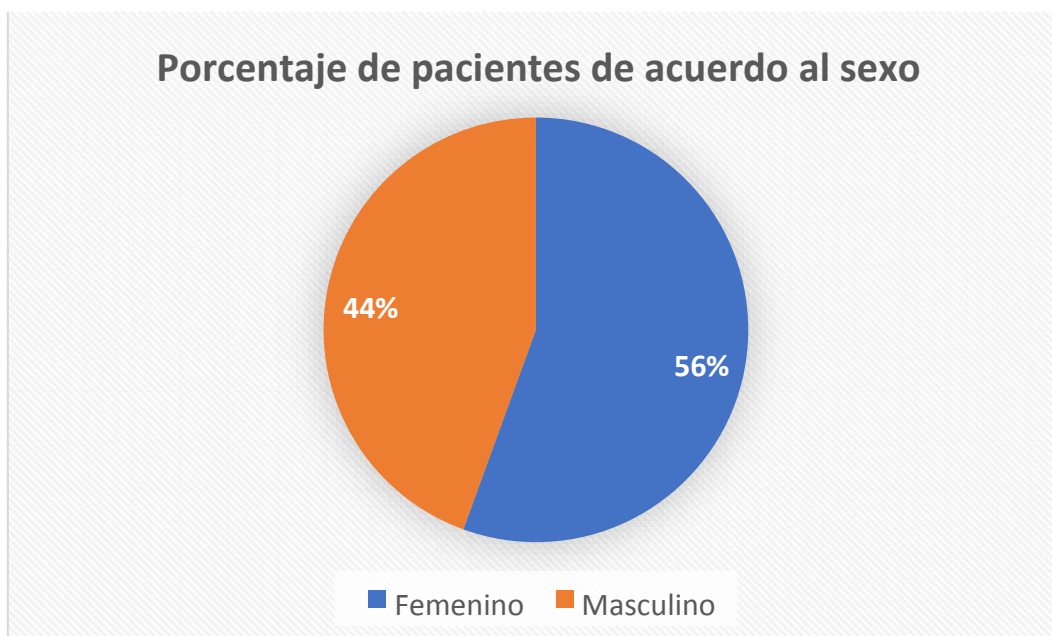


Figura 4. Porcentaje de pacientes de acuerdo al sexo tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

En la Tabla 10 y Figura 5 se observa que el número de pacientes fumadores incluidos en la investigación, representó el 64,4% del total, de los cuales 18 (40%) pacientes fueron de sexo femenino y 11 (24%) de sexo masculino que, de acuerdo, con la información recopilada se estableció que fumaban más de 20 cigarrillos al día y a pesar de que ya no presentan este hábito, su historial influye en su condición actual. Los no fumadores corresponden al 35,6 % del total, de los cuales 7 (16%) pacientes corresponden al sexo femenino y 9 (20%) al sexo masculino.

Estos resultados estratificados por sexo concuerdan con lo presentado por el Registro Nacional de Tumores de SOLCA Núcleo de Quito en el 2014, en donde, se establece que existe un mayor porcentaje de pacientes de sexo femenino que presentan el hábito de fumar y que desarrollan cáncer de pulmón, a diferencia de los pacientes de sexo masculino con el mismo hábito. Esto podría deberse a que uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de esta enfermedad en general es el consumo de tabaco, pese a que estudios han revelado específicamente que para el adenocarcinoma pulmonar, existe igual riesgo tanto en fumadores como en no fumadores para su padecimiento (Villalba Caloca & Martínez Heredero, 2004), lo cual se ha evidenciado en esta investigación.

Adicionalmente, cabe recalcar que los resultados no concordaron con los datos presentados por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), en donde, se establece que los hombres fuman más que las mujeres, con un 91,5 y 8,5% de un total de 521 220 fumadores, respectivamente (Salud, 2013).

Además, en Europa las investigaciones indican que dentro de la población afectada de no fumadores los casos en mujeres se dan con menor frecuencia, reportándose apenas en el 14,7% del total estudiado (Parente Lamelas et al., 2011), estableciendo que el factor de riesgo más importante para que se desarrolle la enfermedad es la exposición al humo de tabaco o de otras fuentes de contaminación ambiental (Ruano-Ravina, Fernández-Villar, & Barros-Dios, 2017).

Tabla 10.

Frecuencia de pacientes de acuerdo a su condición de fumador, tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

Condición de fumador		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
SI	Femenino	18	40	40
	Masculino	11	24	64
NO	Femenino	7	16	80
	Masculino	9	20	100
Total		45	100	

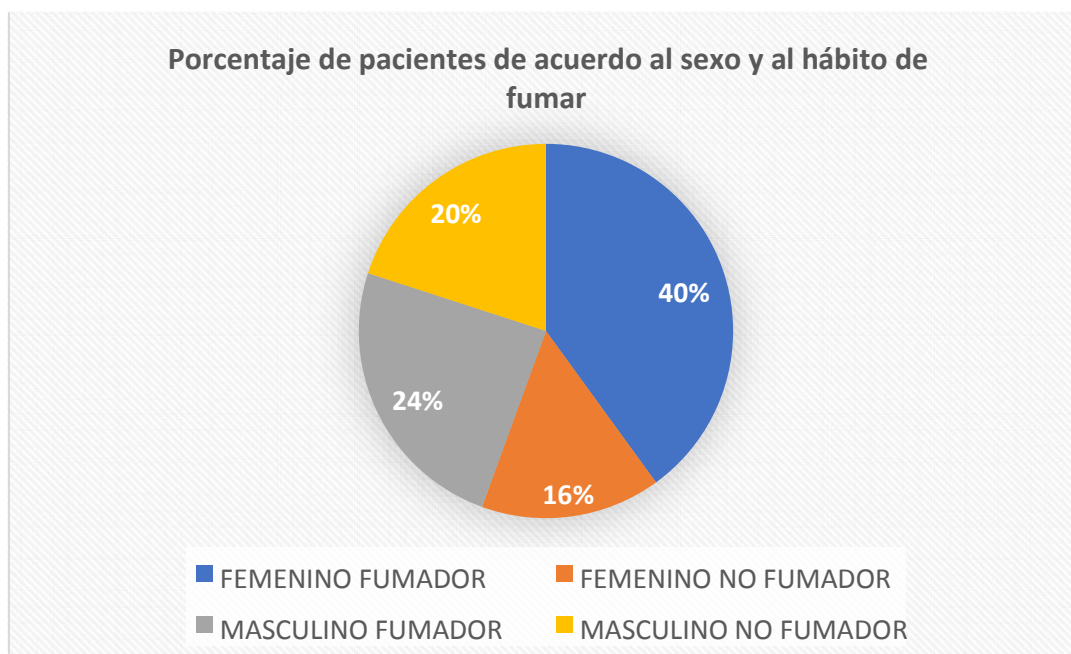


Figura 5. Porcentaje de pacientes de acuerdo a su condición de fumador, tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

De acuerdo a la clasificación de la enfermedad según el estadio en el que fueron diagnosticados los pacientes se pueden observar los resultados en la Tabla 11 y Figura 6, en donde se refleja que, ocurren en igual porcentaje tanto en el estadio 1 como el estadio 3 con un 22,2%, lo que corresponde a 10 pacientes en cada caso, a su vez el estadio que presenta un mayor porcentaje es el 2, en cual se encuentran 16 de los 45 pacientes en estudio con un 35,6%, ubicándose finalmente el estadio 4 con 9 pacientes correspondientes al 20%.

Estos resultados no guardan relación con otros estudios realizados, por Arne Warth y colaboradores en el 2012, quienes establecieron que el estadio en el que se observó un mayor número de pacientes fue en el 1, seguido del estadio 3, el estadio 2 (Warth et al., 2012) y finalmente el estadio 4; además, en el estudio de Hiroshi Hirano y colaboradores en el 2015, el estadio con mayor número de casos fue el 1 con 34 pacientes, seguido del 3 con 31 pacientes y finalmente el con 22 pacientes (Hirano et al., 2015). Estos dos estudios concuerdan entre sí, mostrando que el estadio en donde se encontró una mayor incidencia de pacientes fue el 1, sin embargo, no guardan relación con nuestro estudio que presentó un mayor número de casos en el estadio 2.

Si bien son desconocidos los datos de diagnóstico preliminar del cáncer de pulmón de los pacientes estudiados y la información disponible es el resultado de la biopsia confirmatoria, es importante mencionar que otros investigadores como Viñes en el 2007, Saldías y Bertó el 2016, han demostrado que se puede detectar el cáncer de pulmón en estadios tempranos, mediante el uso de la técnica de la tomografía computarizada de baja dosis; lo que permite detectar esta patología en mediante una tomografía computarizada de tórax. Adicionalmente, Saldías detecto la enfermedad cuando se encontraba en etapas precoces como en este caso el estadio I en un 77.8% de los casos (Bertó & Zulueta, 2016) (Saldías et al., 2016a), lo que ha resultado efectivo para detectar el cáncer de pulmón en estadios iniciales (Viñes, 2007).

Es importante recalcar que, la detección de la enfermedad en estadios iniciales ha contribuido en la reducción de la mortalidad en quienes padecen cáncer de pulmón (Bertó & Zulueta, 2016), sin embargo, se conoce que actualmente el

cáncer de pulmón es diagnosticado la mayoría de las veces en etapas muy avanzadas de la enfermedad, como en el estudio realizado en el Servicio de Oncología del Hospital General Universitario Carlos Manuel de Céspedes durante los años 2013 a 2015 en donde se determinó la supervivencia y se obtuvo como resultado una media de supervivencia fue de 240.83 días, lo cual da una corta expectativa de vida de menos de un año debido al diagnóstico tardío (Romero Moratalla, G., Romero Moratalla, A., Moratalla Sosa, M., & Hidalgo Aparicio, Y.,2016).

Tabla 11.

Frecuencia de pacientes de acuerdo al estadio de la enfermedad, tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

Estadio de la enfermedad	Frecuencia	Porcentaje
Estadio 1	10	22.2
Estadio 2	16	35.6
Estadio 3	10	22.2
Estadio 4	9	20
Total	45	100

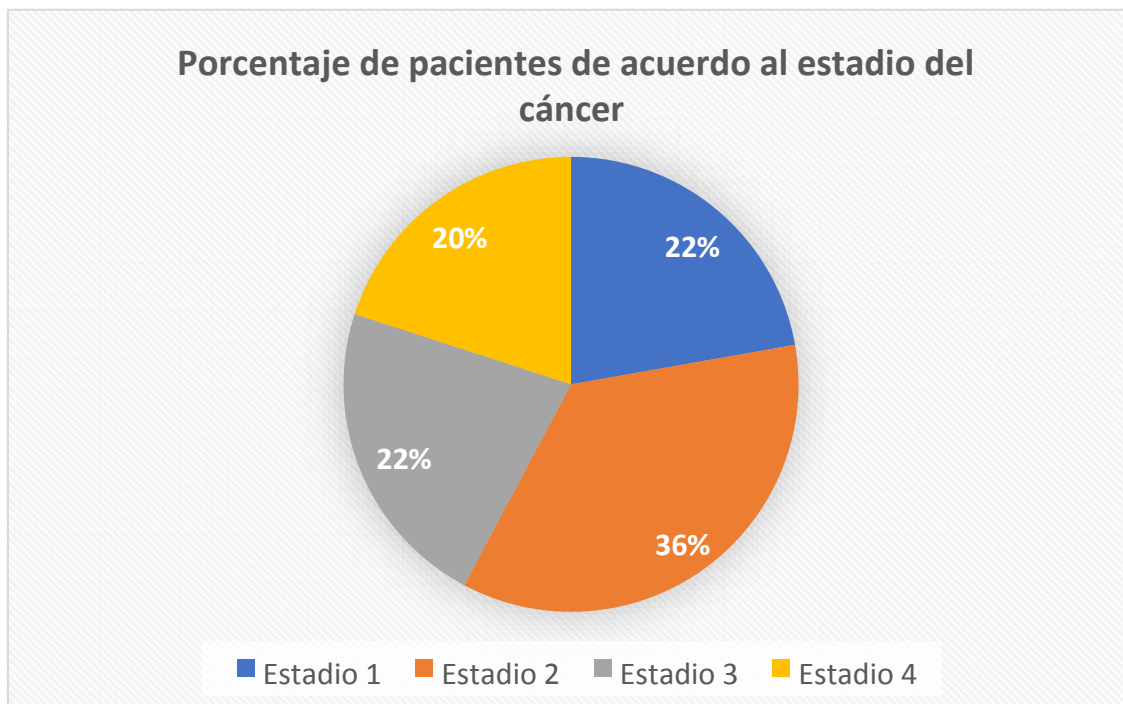


Figura 6. Porcentaje de pacientes de acuerdo al estadio de la enfermedad, tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

Cabe mencionar que, de las 45 muestras, 41 se encontraban en el rango de edad sobre los 50 años, es decir, el 91.1%, siendo el rango de edad 3 (66-85 años) el que se presenta en mayor número de casos con el 49% como se evidencia en la Figura 7. Esto concuerda con otras investigaciones realizadas por diferentes autores como Hirano en el 2015 y Saldías en el 2016, que han establecido el rango de edad en el que se presenta con mayor frecuencia el cáncer de pulmón entre 50 – 80 años, siendo esto, uno de los principales factores para el desarrollo de la enfermedad (Hirano et al., 2015) (Saldías et al, 2016b).

Adicionalmente en el estudio realizado por Warth en el 2012 los pacientes fueron diagnosticados en mayor porcentaje en edades sobre los 62 años (Warth et al., 2012). Esto puede deberse a que a medida que la edad avanza se produce un mayor riesgo de padecer la enfermedad debido a que existe una elevada exposición a sustancias químicas carcinógenas, aparición de enfermedades

pulmonares, factores genéticos y mutaciones que se pueden ir acumulando en partes importantes del genoma para favorecer el desarrollo de la enfermedad (Acosta Reynoso et al, 2016).

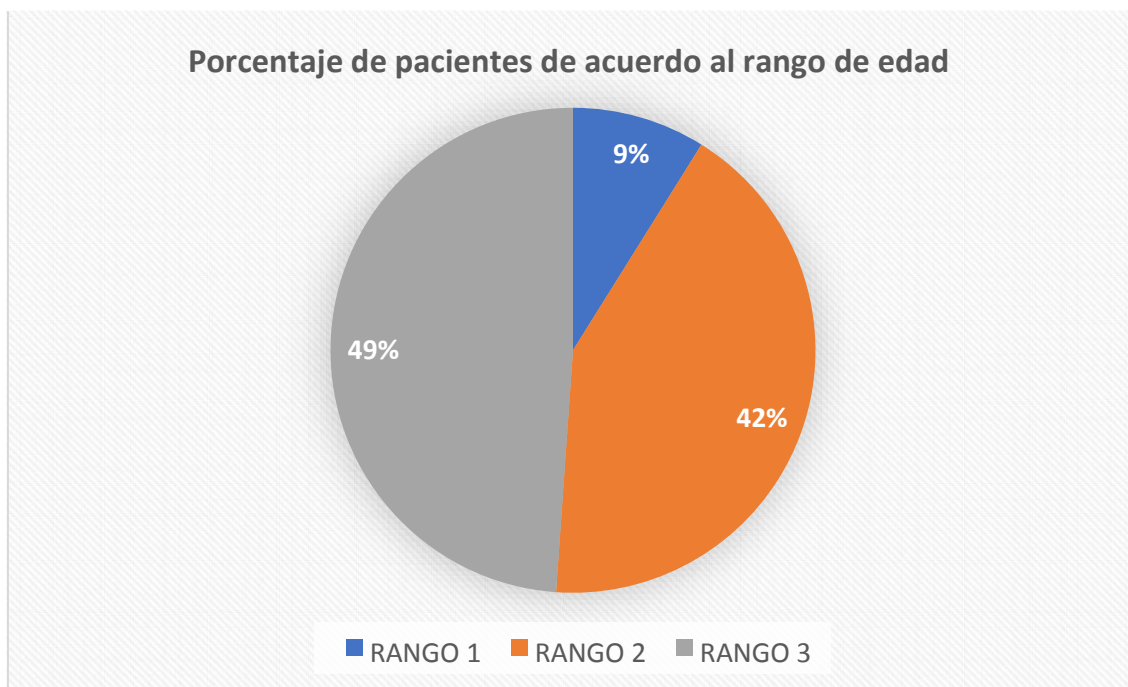


Figura 7. Porcentaje de pacientes de acuerdo al rango de edad en el que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016. Al rango 1 pertenecen las edades comprendidas entre 26 – 45 años, al rango 2 pertenecen las edades comprendidas entre 46 – 65 años y al rango 3 pertenecen las edades comprendidas entre 66 – 85 años.

5.2. Análisis de asociación de variables clínico patológicas con el estadio de la enfermedad

En la Tabla 12 se puede observar los resultados de la prueba de independencia de las variables de chi cuadrado (χ^2), en donde, se relacionó el estadio de la enfermedad con las variables: hábito de fumar, sexo y edad.

Se obtuvo como resultado que los pacientes dentro del grupo que presentaron el hábito de fumar en el estadio 2 se encontraron el mayor número de casos con 11 pacientes para este grupo, lo que corresponde al 24.44% del total, el estadio 3 con 7 pacientes que representa el 15.55% y finalmente el estadio 4 con 5 pacientes que representa el 11.11% del total; así mismo, el grupo de no fumadores en el estadio 1 se encontraron 6 pacientes con el 13.3%. Estos valores no pudieron ser contrastados, ya que en la actualidad existen muy pocos datos disponibles con respecto a la asociación de los estadios en los diferentes tipos de cáncer de pulmón con variables clínico-patológicas.

Como se puede observar en la Tabla 12 con respecto a la variable hábito de fumar en fumadores el estadio de mayor prevalencia fue el estadio 2 (24.4%) seguido por el estadio 3 (15.6%), luego el 4 (11.1%) y por último el 1 (8.9%), y para no fumadores el estadio de mayor prevalencia fue el estadio 1 (13.3%) seguido por el estadio 2 (11.1%), luego el 4 (8.9%) y por último el 3 (6.7%). Estos resultados no concuerdan con el estudio de Hirano y colaboradores realizado entre el 2002 y 2011 en donde realizaron un análisis estadístico de adenocarcinomas de fumadores y no fumadores en etapas I, II y III, esto puede deberse a que ambos estudios usaron una población de estudio muy pequeña. En el estudio Hirano y colaboradores se obtuvieron de resultados en no fumadores el estadio de mayor prevalencia fue el estadio 1 seguido por el estadio 3 y por último el 2, y para no fumadores el estadio de mayor prevalencia fue el estadio 3 seguido por el estadio 1 y por último el 2 (Hirano et al., 2015).

Al mismo tiempo se realizó la asociación de las variables estadio de la enfermedad con el sexo de los pacientes, y se obtuvieron valores iguales para el estadio 1 y 3 con 5 pacientes (11.1%) tanto para mujeres como en hombres y de igual manera se observó valores iguales para el estadio 2 con 8 pacientes (17.8%) tanto para hombres como para mujeres. A diferencia del estadio 4 en el que se observó el valor más alto para mujeres con 7 pacientes lo que corresponde al 15.6% y para hombres el valor más bajo con 2 pacientes que corresponde al 4.4%. Nuestros datos no se asemejan a otros estudios, en donde se ha

demostrado que en mujeres existe una mayor prevalencia del estadio 1 con 23% seguido del estadio 3 con 21% y por último el estadio 2 con 17%, mientras que en los hombres con la mayor prevalencia el estadio 1 con 16% seguido del estadio 3 con 15% y por último el estadio 2 con 8% (Hirano et al., 2015).

Finalmente, en la asociación de las variables estadio de la enfermedad con edad de los pacientes se obtuvo como resultado que el rango de edad con menor número de pacientes fue el rango 1 con edades comprendidas entre 26 – 45 años en los cuatro estadios con un 8.88% del total y el valor más elevado corresponde a los pacientes que se encuentran en el estadio 2 en el rango de edad 46 – 65 años con 9 pacientes (20%) seguido del rango 3 con edades comprendidas entre 66 – 85 años en el mismo estadio en donde se encontró 7 pacientes (15.5%). Es así, que como se muestra, las mayores frecuencias para todos los estadios están en los dos últimos rangos de edad de entre 46 a 85 años. Estos datos concuerdan con los resultados de Hirano y colaboradores, los cuales establecen que el adenocarcinoma se diagnostica ya en edades avanzadas. Los investigadores establecieron que para el estadio 1 el rango de edad promedio se encuentra entre los 55 a 79 años, para el estadio 2 el rango de edad promedio se encuentra entre los 59 a 74 años y para el estadio 3 el rango de edad promedio se encuentra entre los 48 a 82 años (Hirano et al., 2015).

Adicionalmente, el resultado de la prueba de independencia de variables chi cuadrado para las variables hábito de fumar, sexo y edad con el estadio de la enfermedad arrojó el valor p de 0.446, 0.522 y 0.357 respectivamente; lo que indica que estas variables no están relacionadas entre sí. Esto puede deberse a que el estudio presenta un n muestral pequeño, la cual no permite que exista significancia entre las variables; que el adenocarcinoma de pulmón se presenta tanto en personas fumadoras como no fumadoras.

Tabla 12.

Independencia de variables con la asociación del estadio de la enfermedad con el hábito de fumar, sexo y la edad de los pacientes tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

Variable		Estadio 1		Estadio 2		Estadio 3		Estadio 4		Valor p
		NP	%	NP	%	NP	%	NP	%	
Hábito de fumar	SI	4	8.9	11	24.4	7	15.6	5	11.1	0.446
	NO	6	13.3	5	11.1	3	6.7	4	8.9	
Sexo	F	5	11.1	8	17.8	5	11.1	7	15.6	0.522
	M	5	11.1	8	17.8	5	11.1	2	4.4	
Edad	26-45	1	2.2	0	0	2	4.4	1	2.2	0.357
	46-65	3	6.7	9	20	5	11.1	2	4.4	
	66-85	6	13.3	7	15.6	3	6.7	6	13.3	

Nota: En la tabla se puede observar la asociación de las variables clínico patológicas de los pacientes tomados para el estudio, en donde, se relaciona el estadio de la enfermedad que consta de 4 estadios con el hábito de fumar (si o no), sexo (femenino o masculino) y la edad que consta de tres rangos (26-45, 46-65, 66-85). Se presenta el porcentaje de la relación del estadio con las diferentes variables (%) y el valor de la prueba de chi cuadrado, en donde, $p < 0.05$ se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula. Siendo NP número de pacientes.

5.3. Amplificación del gen *runx3* en pacientes con adenocarcinoma de pulmón mediante PCR específica de metilación

Luego de la extracción de ADN, se pudo observar que la muestra número 14 presentó la mayor cantidad de ADN (85,9 ng/uL) mientras que de la muestra 31 se obtuvo la menor cantidad (0,6 ng/uL), como se observa en la Tabla 13.

La razón por la que algunas muestras tuvieron baja concentración de ácidos nucleicos pudo deberse a la cantidad de parafina presente en relación al tamaño de tejido encontrado en el bloque, y a ciertos compuestos utilizados en la conservación de los tejidos como el formol, que es un aldehído volátil que tiende a formar entrecruzamientos entre el ADN y proteínas e hidrolizar los puentes fosfodiéster, dificultando de esta manera la obtención de material genético de buena calidad y la amplificación del mismo (García, Benavente, Melo, Roa, & Roa, 2006).

Sin embargo, se observó que la cantidad obtenida en todas las muestras fue óptima para su uso con el Kit de conversión de ADN con bisulfito (*Cells-to-CpG™ Bisulfite Conversion Kit*) el cual requiere una concentración de ADN genómico entre 0,002 -100 µg (Promega, USA).

Los valores de la relación 260/280 para las 45 muestras analizadas se encuentran en el rango esperado, como se puede observar en la Tabla 13, lo que indica que el ADN obtenido tuvo una concentración de proteínas mínima. Sin embargo, existen algunos valores mayores a 2,1 lo que supuso que la muestra pudo haber estado contaminada con ARN (Escrig, 2003).

Tabla 13.

Concentración y pureza de ADN de los pacientes tomados para el estudio, que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

ID Muestra	Concentración Ácido nucleico (ng/ µL)	Relación 260/280 nm	ID Muestra	Concentración Ácido nucleico (ng/ µL)	Relación 260/280 nm
1	61,3	1,94	24	42,8	1,94
2	26,6	2,13	25	5,1	1,49
3	15	2,24	26	66,1	1,91
4	51,6	1,9	27	27,5	1,84
5	59,4	1,91	28	8,6	1,92
6	8,9	2,33	29	28,4	1,86
7	36,9	1,87	30	40,7	1,89
8	25,4	1,77	31	0,6	0,72
9	26	1,73	32	22,7	1,85
10	13,9	1,57	33	20,8	1,92
11	29,4	1,62	34	42,1	1,75
12	46,8	1,84	35	18,2	1,79
13	30	1,93	36	32,4	1,89
14	85,9	1,89	37	22,7	1,71
15	53,3	1,87	38	15,6	1,66
16	11,1	1,79	39	23,9	1,85
17	8,8	2,42	40	48,7	1,87
18	59,8	1,88	41	27,1	1,89
19	6,9	2,46	42	11,8	1,83
20	59,3	1,9	43	8,3	1,51

21	13,3	2,5	44	24,9	1,82
22	8,5	1,84	45	75	1,95
23	21,7	1,97			

De las 45 muestras seleccionadas para el estudio únicamente se pudo evidenciar 18 muestras en los geles de agarosa que se detallan a continuación. En Figura 8 se observa la amplificación de *runx3* en gel de agarosa al 1,5%, los productos de la PCR de metilación, que tuvieron un peso de 220 pb. y pertenecieron al primer grupo de muestras utilizando solamente los primers específicos para metilación. En el pocillo marcado con el número 1 se observa el marcador de peso molecular de 100 pb., seguido de los productos de la PCR de las muestras 1 a las 14 ubicadas de forma ascendente en los pocillos siguientes y en el último pocillo se aprecia el control negativo.

MUESTRAS METILADAS

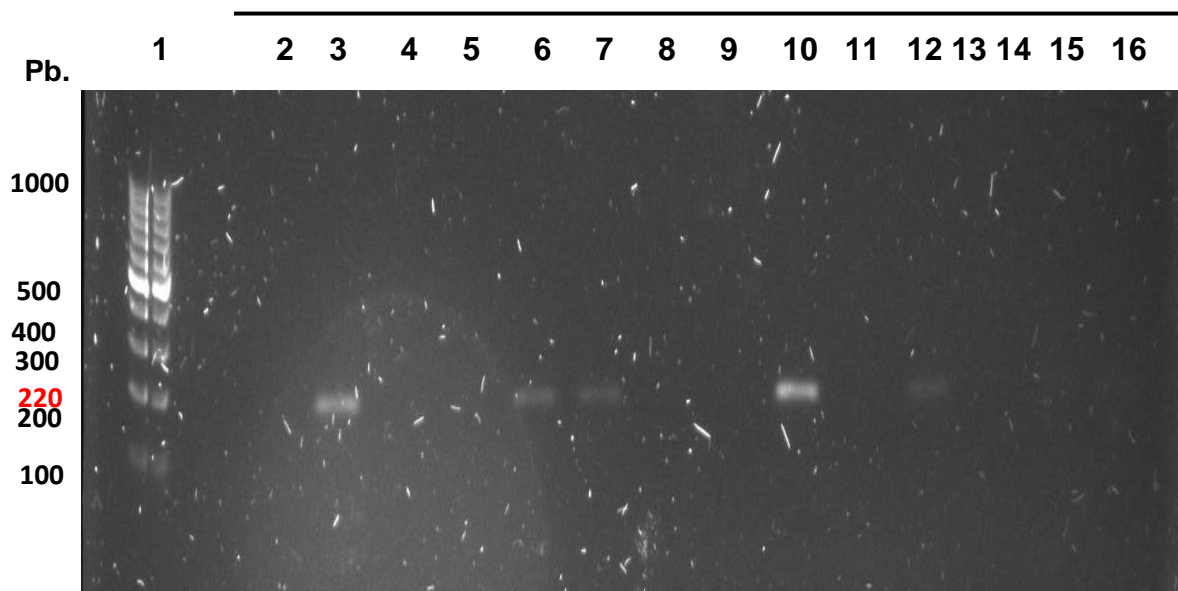


Figura 8. Visualización del gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR específica de metilación para la amplificación del gen *runx3*, pertenecientes al primer grupo de muestras utilizando los primers metilados.

En las Figuras 9 y 10 se observan los productos de la PCR del gen *runx3* en los geles de agarosa al 1,5%, los productos de PCR de metilación tuvieron un peso de 220 pb. y pertenecieron a las muestras de la 1 a la 8 y de la a las 16 respectivamente. En la figura 9 se observa en el pocillo marcado con el número 1 al marcador de peso molecular de 100 pb., seguido del control positivo en el pocillo 2, la muestras 1 en los pocillos 3 y 4, la muestras 2 en los pocillos 5 y 6, la muestra 3 en los pocillos 7 y 8, la muestras 4 en los pocillos 9 y 10, la muestras 5 en los pocillos 11 y 12, la muestra 6 en los pocillos 13 y 14, la muestra 7 en los pocillos 15 y 16, la muestras 8 en los pocillos 17 y 18; pertenecientes a los productos de la PCR de las muestras primero utilizando el par de primers específicos para metilación seguido los productos de la PCR de las muestras utilizando el par de primers específicos para la no metilación. Finalmente el pocillo 19 se encuentra el control negativo.

MUESTRAS METILADAS Y NO METILADAS

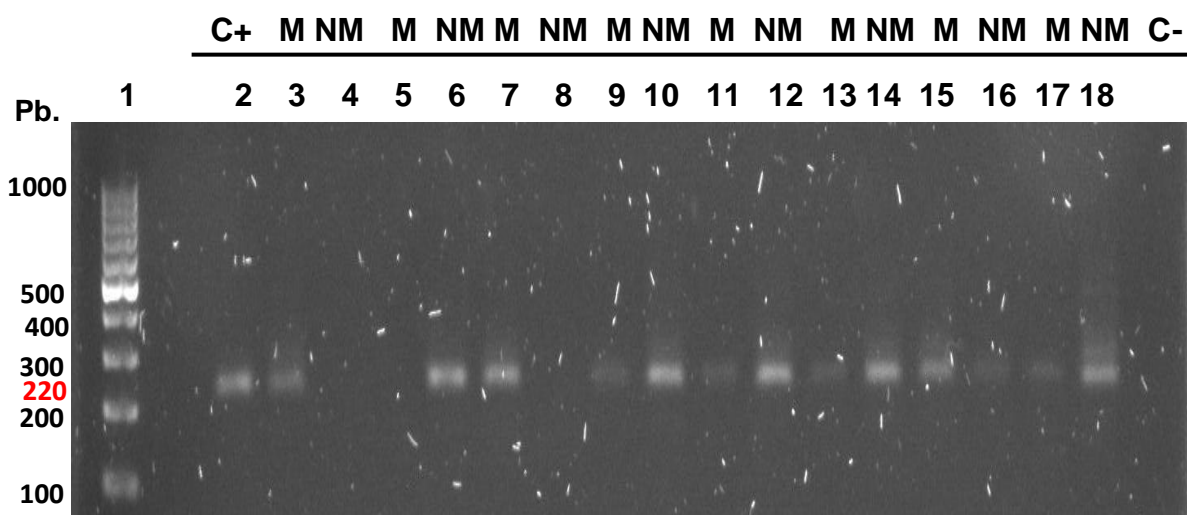


Figura 9. Visualización del gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR específica de metilación para la amplificación del gen *runx3*, pertenecientes a las muestras de la 1 a la 8.

En la Figura 10 se puede observar en el pocillo marcado con el número 1 al marcador de peso, seguido del control positivo en el pocillo 2, la muestras 9 en los pocillos 3 y 4, la muestras 10 en los pocillos 5 y 6, la muestra 11 en los pocillos 7 y 8, la muestras 12 en los pocillos 9 y 10, la muestras 13 en los pocillos 11 y 12, la

muestra 14 en los pocillos 13 y 14, la muestra 15 en los pocillos 15 y 16, la muestras 16 en los pocillos 17 y 18; finalmente el pocillo 19 se encuentra el control negativo.

MUESTRAS METILADAS Y NO METILADAS

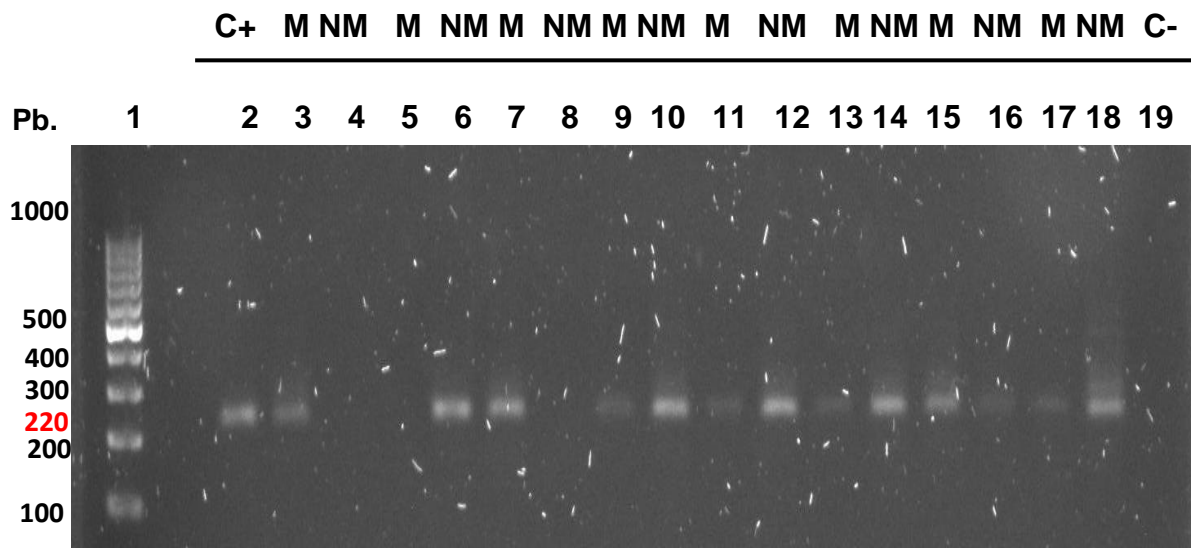


Figura 10. Visualización del gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR específica de metilación para la amplificación del gen runx3, pertenecientes a las muestras de la 9 a la 16.

Nuestros resultados no fueron confiables, ya que hubo presencia de doble banda en la Figura 14 en los pocillos del 9 al 18. Dentro de las posibles causas de estos resultados encontramos: la no utilización de controles positivos para metilación y no metilación del kit, la inadecuada optimización de la PCR de metilación, la falta de pruebas posteriores para la verificación a nivel de secuenciación, la dificultad de trabajar con muestras embebidas en parafina y la mezcla de tejidos de diferentes bloques.

En cuanto a la no utilización de los controles positivos, si bien los mismos eran requeridos para validar la amplificación de manera específica por parte del kit, estos no fueron empleados, lo cual invalidó los resultados al obtenerse dobles bandas, como ya se mencionó anteriormente. Es importante recalcar que esta

PCR alelo específica de metilación es una técnica muy sensible y específica, ya que puede amplificar pequeñas cantidades de ADN, siendo capaz de detectar la metilación inclusive cuando solo el 0.1 % de los alelos se encuentran metilados; por lo que es fundamental la utilización de controles positivos que validen los ensayos como verdaderos positivos y/o negativos. Sobre todo, porque este tipo de PCR puede arrojar falsos positivos muy comúnmente, al poseer una alta manipulación de las muestras examinadas, así como mezcla habitual de tejidos en una misma biopsia (Tost, 2009). Por otra parte, cabe recalcar que en este tipo de estudios se debe emplear un tipo de sensibilidad llamada “sensibilidad analítica” la cual está definida como “la proporción más pequeña detectable de plantilla metilada en un fondo de plantilla no metilada”, con el fin de validar los resultados obtenidos, ensayo que, no fue determinado en esta investigación (Kristensen & Hansen, 2009).

Adicionalmente, el fabricante del kit empleado también recomienda el uso de controles positivos y negativos durante la conversión del ADN con bisulfito en paralelo con las muestras, ya que el material genético de trabajo puede contener impurezas que afecten a la eficiencia de la conversión y con esto se “garantiza que más del 99% de las citosinas estén convertidas y que más del 99% de las islas de CpG metiladas estén protegidas” (Promega, USA). Al no disponer de los controles positivos, esto pudo afectar los resultados obtenidos, arrojando falsos positivos y/o negativos, como ya se mencionó. Cabe recalcar, que el tratar el ADN con bisulfito puede ocasionar algunos problemas como originar una reacción parcial o una desnaturalización incompleta lo que puede conducir a los investigadores hacia una mal interpretación de los resultados (Barreto et al., 2007), así como también, puede ocasionar la descomposición del ADN, disminuyendo el número de moléculas útiles para la PCR de metilación es por eso que el ADN convertido debe cuantificarse antes de realizar la PCR (Hernández, Tse, Pang, Arboleda, & Forero, 2013).

Por otra parte, para garantizar la sensibilidad y especificidad de la PCR, es necesario realizar varios ensayos en los que se varíen algunas condiciones entre

las cuales se incluyen: la temperatura de hibridación, concentración de cebadores, de MgCl₂, etc. También es importante partir de cebadores adecuadamente diseñados y específicos para este tipo de PCR, para lo que Hernández y colaboradores sugieren que se puede experimentar con ADN convertido con bisulfito junto a distintos conjuntos de primers que amplifiquen productos de distintos tamaños para así determinar la longitud idónea del amplicón para su posterior análisis (Hernández et al., 2013). A su vez, para optimizar la PCR de metilación Giorgio y colaboradores variaron la concentración de MgCl₂ y de primers en donde obtuvieron los mejores resultados con la concentración de 3 mM de MgCl₂ y 20 pmol de primers, además utilizaron 4 diferentes gradientes de temperatura de hibridación en donde únicamente las temperaturas de 58 °C, 56 °C y 54 °C permitieron obtener el amplicón buscado, es decir la estrategia consiste en tener un ciclado con 3 temperaturas de hibridación que vayan en forma descendente (Giorgio, Chaneton, & Zapata, 2009). Por otro lado, Shen y colaboradores establecieron que la temperatura de hibridación óptima para la PCR de metilación es de 55°C a partir del cálculo de la temperatura de melting para sus primers, entonces realizaron un ensayo con tres distintas temperaturas de annealing 50°, 55° y 60 ° C y observaron que los niveles de metilación aumentaron proporcionalmente a mayor Ta para los genes de metilación moderada mientras que para los genes con alta metilación no observaron ninguna variación (Shen, Guo, Chen, Ahmed, & Issa, 2007).

Así mismo, sobre el problema de la falta de pruebas posteriores para la verificación a nivel de secuenciación, se puede resolver mediante la verificación de la secuencia de metilación analizando el producto de la PCR obtenido mediante técnicas como la secuenciación, el uso de enzimas de restricción, southern blot, entre otros (Derks et al., 2004) (Bock et al., 2005). La secuenciación de los productos de la PCR comprueba que la mayor parte de las citocinas fueron convertidas y que las denominadas islas CpG metiladas se encuentren intactas (Hernández et al., 2013). En los últimos años, se han utilizado enzimas de restricción como método de análisis de regiones con ADN metilado, estas tienen la capacidad de cortar solo sitios metilados ya que son endonucleasas que usan

ADN metilado como sustrato, consiguiendo la amplificación selectiva de ADN metilado generando fragmentos de 32 pb. junto al sitio de reconocimiento totalmente metilado que contiene las islas CpG. El número de lecturas obtenidas para el fragmento específico de 32 pb. obtenido indica el nivel de metilación, al mismo tiempo estos fragmentos pueden ser secuenciados para luego alinearlos con el genoma de interés. La desventaja del uso de enzimas de restricción es que se requiere ADN de alta calidad (Kurdyukov & Bullock, 2016) y que algunas no pueden cortar las secuencias que contienen uno o más sitios CpG metilados. Es por esto, que además se utiliza otra técnica como la hibridación Southern para el rastreo de regiones metiladas en el ADN, la cual facilita la identificación del estado de metilación total de las islas CpG, sin embargo, requiere una gran cantidad de ADN de alto peso molecular y solo detecta la metilación si se encuentra en más de un pequeño porcentaje de los alelos (Herman, Graff, Myöhänen, Nelkin, & Baylin, 1996). Finalmente, existen estudios en donde se trabaja con ADN metilado y ADN no metilado, optimizando la PCR con un mix de los dos tipos de ADN para asegurarse que la amplificación sea con el conjunto de primers correcto (Smith, Bianco-Miotto, Drew, & Watson, 2003).

Para complementar, en cuanto al uso de cortes de tejido a partir del bloque de parafina, este proceso pudo haber ocasionado problemas de contaminación cruzada entre pacientes ya que se usó una sola cuchilla para todas las muestras sin limpieza entre cortes. En el manual de técnicas histológicas de Russo establece que se debe limpiar la cuchilla de manera muy cuidadosa con xilol al terminar cada corte de tejido con el fin de eliminar los restos de parafina ya que pueden contener restos de ADN de otras muestras dando como resultado una contaminación entre pacientes (dados en el Complejo Hospitalario & Guerrero, s.f.). También dentro del tejido contenido en el bloque se puede encontrar pequeñas partes con tejido sano ya que los médicos no siempre serán precisos al momento de tomar la muestra incluyendo tanto tejido necrosado como tejido en buen estado.

Para finalizar podemos decir que el uso de muestras en parafina pudo aumentar el número de falsos negativos en nuestro estudio, ya que se ha visto que la parafina interfiere en la eficiencia de la PCR. Estudios han señalado que la calidad y la cantidad de ADN obtenido puede ser baja debido a ciertas características que garantizan la conservación de los bloques de parafina como el pH, la temperatura, la concentración de formol, el tamaño del tejido. Estudios han informado que el formol contenido en las muestras provoca un cruce de ácidos nucleicos y proteínas, hidroliza los puentes fosfodiéster del ADN provocando la fragmentación de este y reduce el rendimiento de la PCR (Ramírez, Salazar, Castillo, & Montoya, s.f.). Cabe mencionar que en esta investigación el amplicón fue de 220 pb., tamaño que puede ser algo grande para ser obtenido a partir de una muestra de parafina, ya que algunos autores recomiendan, que el mismo sea de entre 300-400 pb. (Satiroglu-Tufan, Bir, & Duzcan, 2004). Sin embargo, como ya se mencionó los fijadores de las muestras embebidas en parafina provocan modificaciones en los ácidos nucleicos lo cual conlleva a la fragmentación del ADN y con eso que solo se puedan amplificar fragmentos con tamaños de entre 100 a 400 pb. (Bustamante, Astudillo, PAZOS, & Bravo, 2011) (Agilent Technologies, 2016).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

El adenocarcinoma de pulmón fue el más prevalente en la población estudiada en pacientes del sexo femenino con un 11.2% más que lo presentado en pacientes del sexo masculino.

Los pacientes con adenocarcinoma de pulmón presentaron una mayor frecuencia y se considera que el hábito de fumar es uno de los factores de riesgo más prevalente.

El adenocarcinoma de pulmón se presenta con mayor frecuencia en pacientes del sexo femenino.

El diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón se realizó en estadios tardíos y ésta es la causa de la alta tasa de mortalidad a nivel mundial, sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad en estadios iniciales fue consecuencia de un estudio por imagen oportuno; presentando porcentajes similares los estadios 1 y 3 concluyendo que una detección oportuna puede contribuir a una mejor calidad de vida del paciente.

El rango de edad comprendido entre 66 – 85 años presentó un mayor número de pacientes con un 49% del total, estableciendo que la edad es influyente en el desarrollo de adenocarcinoma de pulmón.

6.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar el proyecto en un laboratorio completamente equipado y que garantice la culminación de proyecto, debido a que el traslado tanto de las muestras como los reactivos puede ocasionar inconvenientes en la realización de los procedimientos.

Se recomienda emplear varios cortes de la muestra embebida en parafina debido a que con la cantidad de parafina que posee, el material biológico puede llegar a no ser suficiente luego de la desparafinización.

Se recomienda realizar más de un lavado con xilol y etanol absoluto debido que es muy probable una contaminación por la parafina que se emplea para almacenar y conservar las muestras.

El tamaño de muestra es importante para que sea un estudio válido a nivel nacional, es por este motivo que se recomienda ampliar la investigación con un tamaño de muestra mayor y que abarque a pacientes de varias regiones del Ecuador debido a que la muestra empleada en este estudio no es representativa de la población.

Es importante establecer que el análisis realizado debe contener estudios complementarios de secuenciación para asegurar la especificidad y sensibilidad de la técnica y que pueda ser empleada a futuro para estudios posteriores.

Es indispensable emplear controles tanto positivos como negativos ofertados por las casas comerciales debido a que esto contribuye a obtener una elevada sensibilidad y especificidad, evitando la presencia de resultados erróneos.

REFERENCIAS

- American Cancer Society.* (2014). Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos. Atlanta: Sociedad Americana Contra El Cáncer. Recuperado el 20 de enero de 2017 de <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/document/s/document/acspc-036792.pdf>
- Acosta Reynoso, I. M., Remón Rodríguez, L., Segura Peña, R., Ramírez Ramírez, G., & Carralero Rivas, Á. (2016). Factores de riesgo en el cáncer de pulmón. *Correo Científico Médico*, 20(1), 42–55. Recuperado el 18 de mayo de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000100005
- Agilent Technologies.* (2016). *Agilent. Introduction to Quantitative PCR - Methods and Applications Guide* (PDF) Recuperado el 17 de febrero de 2018 de https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf
- Aguilera, O., Fernández, A. F., Muñoz, A., & Fraga, M. F. (2010). *Epigenetics and environment: a complex relationship. Journal of Applied Physiology*, 109(1), 243–251. Recuperado el 7 de febrero de 2018 de <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00068.2010>
- Amigo, L. P., Universitario, S. de N. C. H., & Xeral-Cíes, V. (2005). Biología molecular y cáncer de pulmón. *Sogapar. Org/pneuma*, 3, 135–137. Recuperado el 20 de abril de 2017 de <https://www.sogapar.info/wp-content/uploads/2010/08/pneuma-n-3-2.pdf>
- Amorín Kajatt, E. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 30(1), 85–92. Recuperado el 17 de febrero del 2017 de

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000100017

- Araki, K., Osaki, M., Nagahama, Y., Hiramatsu, T., Nakamura, H., Ohgi, S., & Ito, H. (2005). *Expression of RUNX3 protein in human lung adenocarcinoma: Implications for tumor progression and prognosis. Cancer Science*, 96(4), 227–231. Recuperado el 22 de febrero de 2018 de <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00033.x>
- Bagchi, A., & Mills, A. A. (2008). *The Quest for the 1p36 Tumor Suppressor. Cancer Research*, 68(8), 2551–2556. Recuperado el 18 de febrero de 2017 de <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2095>
- Bangsow, C., Rubins, N., Glusman, G., Bernstein, Y., Negreanu, V., Goldenberg, D., Levanon, D., others. (2001). *The RUNX3 gene—sequence, structure and regulated expression. Gene*, 279(2), 221–232. Recuperado el 24 de abril de 2017 de <https://pdfs.semanticscholar.org/42a0/3ef1583543b2f6a6d623db3925886c882300.pdf>
- Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Lyko, F. (2007). *Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repairmediated DNA demethylation. Nature*, 445(7128), 671. Recuperado el 17 de febrero 2018 de [10.3410/f.1066951.519917](https://doi.org/10.3410/f.1066951.519917)
- Bertó, J., & Zulueta, J. J. (2016). El cribado del cáncer de pulmón mediante tomografía computarizada de baja dosis de radiación. Posición a favor. *Gaceta Sanitaria*, 30(5), 386–388. Recuperado el 16 de abril de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2016.07.001>
- Bock, C., Reither, S., Mikeska, T., Paulsen, M., Walter, J., & Lengauer, T. (2005). *BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. Bioinformatics*, 21(21), 4067–4068. Recuperado el 2 de febrero de 2018 de <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti652>

- Bustamante, J. A., Astudillo, M., PAZOS, A. J., & Bravo, L. E. (2011). Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 83–98. Recuperado el 5 de febrero de 2018 de [10.15446/abc](https://doi.org/10.15446/abc)
- Carcereny, E. (2013). *Carcinoma de pulmón en no fumadores*. Marge Medica Books. Recuperado el 16 de abril de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=IWZaAQAAQBAJ>
- Chen, F., Liu, X., Bai, J., Pei, D., & Zheng, J. (2016). *The emerging role of RUNX3 in cancer metastasis (Review)*. *Oncology Reports*, 35(3), 1227–1236. Recuperado el 20 de noviembre de 2017 de <https://doi.org/10.3892/or.2015.4515>
- Chuang, L. S. H., & Ito, Y. (2010). *RUNX3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors*. *Oncogene*, 29(18), 2605. Recuperado el 20 de noviembre de 2017 de [10.1038/onc.2010.88](https://doi.org/10.1038/onc.2010.88)
- Concepción J. Puerta B. y Claudia P. Ureña P. (2005). *Prácticas de biología molecular*. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado el 20 de junio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=pTrKpnFCIZQC>
- Cueva, P., & Yépez, J. (2014). *Cancer Epidemiology in Quito and other Ecuadorian Regions. National Cancer Registry (NCR), SOLCA.*, 15, 1-225. Recuperado el 17 de febrero de 2017 de https://issuu.com/solcaquito/docs/epidemiologia_de_cancer_en_quito_20
- Dados en el Complejo Hospitalario, P., & Guerrero, A. (s.f.). *Las Técnicas histológicas en el CHAG*. Recuperado el 5 de febrero de 2017 de <file:///C:/Users/costco1/Documents/TESIS/discusion%203/russo.pdf>
- Dean, A., Sullivan, K., & Soe, M. (6 de abril de 2013). *OpenEpi. Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*. Recuperado el 18 de noviembre del 2016 de http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm

- D. C., & M. T. (2013). Manual de oncología clínica. Barcelona, España: Lippincott Williams and Wilkins.
- Delbrück, H. (2002). Cáncer de pulmón. *Herder*. Recuperado el 15 de abril de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=HKbZGAAACAAJ>
- De México, G. M. (2002). BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA NUEVOS GENES INVOLUCRADOS EN LA APARICIÓN DEL CÁNCER FABIO SALAMANCA GÓMEZ Coordinador. FABIO SALAMANCA GÓMEZ. *Gac Méd Méx*, 138(6), 589–590. Recuperado el 26 de febrero de 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2002/gm026m.pdf>
- Derks, S., Lentjes, M. H., Hellebrekers, D. M., de Bruïne, A. P., Herman, J. G., & van Engeland, M. (2004). *Methylation-specific PCR unraveled. Analytical Cellular Pathology*, 26(5-6), 291–299. Recuperado el 10 de febrero de 2018 de 10.1155/2004/370301
- Escrig, A. J. (2003). Manual de neurogenética. Díaz de Santos. Recuperado el 27 de agosto de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=E6XFouOOv38C>
- Ettinger, D. S., Akerley, W., Bepler, G., Blum, M. G., Chang, A., Cheney, R. T.,. (2010). *Non-small cell lung cancer. Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 8(7), 740–801. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de <http://www.jnccn.org/content/8/7/740.long>
- García-Conde, J. (2000). Oncología clínica básica. Arán. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=co3E3qO8_zoC
- García, M. G., Rodríguez, O. A., & de León, D. C. (2012). Oncología y cirugía. Bases y principios: Editorial El Manual Moderno. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=xWTLCQAAQBAJ>
- García, M. P., Benavente, M. F., Melo, A. A., Roa, E. I., & Roa, S. J. C. (2006). Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco

- fijadores. *Revista Española de Patología*, 39(3), 175–179. Recuperado el 6 de febrero de 2018 de <http://www.patologia.es/volumen39/vol39-num3/pdf%20patologia%2039-3/39-03-08.pdf>
- Giorgio, E. M., Chaneton, B. J., & Zapata, P. D. (2009). Optimización de la amplificación mediante PCR de la región promotora 1 del gen shp-1 luego de su tratamiento con bisulfito. *Revista de Ciencia Y Tecnología*, (12), 04–08. Recuperado el 6 de febrero de 2017 de <http://www.scielo.org.ar/pdf/recyt/n12/n12a01.pdf>
- Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J. R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A. G., & Shepherd, F. A. (2011). *Non-small-cell lung cancer. The Lancet*, 378(9804), 1727–1740. Recuperado el 26 de marzo de 2017 de [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62101-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62101-0)
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9821–9826. Recuperado el 7 de febrero de 2018 de <http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC38513&blobtype=pdf>
- Hernández, H. G., Tse, M. Y., Pang, S. C., Arboleda, H., & Forero, D. A. (2013). *Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. BioTechniques*, 55(4). Recuperado el 10 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.2144/000114087>
- Hirano, H., Maeda, H., Yamaguchi, T., Yokota, S., Mori, M., & Sakoda, S. (2015). *Survivin expression in lung cancer: Association with smoking, histological types and pathological stages. Oncology Letters*, 10(3), 1456–1462. Recuperado el 8 de febrero de 2018 de <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3374>
- Ito, Y. (2004). *Oncogenic potential of the RUNX gene family: “Overview.” Oncogene*, 23(24), 4198–4208. Recuperado el 10 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207755>

- Ito, Y., Bae, S.-C., & Chuang, L. S. H. (2015). *The RUNX family: developmental regulators in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 15(2), 81–95. Recuperado el 10 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.1038/nrc3877>
- Jackman, D. M., & Johnson, B. E. (2005). *Small-cell lung cancer*. *The Lancet*, 366(9494), 1385–1396. Recuperado el 14 de marzo de 2017 de [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67569-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67569-1)
- Kristensen, L. S., & Hansen, L. L. (2009). *PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment*. *Clinical Chemistry*, 55(8), 1471–1483. Recuperado el 30 de agosto de 2017 de <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.121962>
- Ku, J.-L., Jeon, Y.-K., & Park, J.-G. (2011). *Methylation-Specific PCR*. In T. O. Tollefsbol (Ed.), *Epigenetics Protocols* (Vol. 791, pp. 23–32). Totowa, NJ: Humana Press. Recuperado el 22 enero de 2018 de http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779316-5_3
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). *DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method*. *Biology*, 5(4), 3. Recuperado el 2 de Agosto de 2017 de <https://doi.org/10.3390/biology5010003>
- Lee, Y.-S., Lee, J.-W., Jang, J.-W., Chi, X.-Z., Kim, J.-H., Li, Y.-H., ... Bae, S.-C. (2013). *Runx3 Inactivation Is a Crucial Early Event in the Development of Lung Adenocarcinoma*. *Cancer Cell*, 24(5), 603–616. Recuperado el 7 de abril de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.003>
- Lecuona, M. A., Guerrero, A., & Leyva, L. (2015). *Medicina general: Diagnóstico en oncología*. Barcelona – España: Elsevier
- León, K. V. (s.f.). *Caracterización de la expresión de Runx2 y Cbfs s a través del ciclo celular, en células ROBmtert y MC3T3*. Recuperado el 20 de abril de 2017 de http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2008/villegas_k/sources/villegas_k.pdf

- Li, Q.-L., Kim, H.-R., Kim, W.-J., Choi, J.-K., Hee Lee, Y., Kim, H.-M., Bae, S.C. (2004). *Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1), 223–228. Recuperado el 20 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.079>
- Macías, R. M. (2009). *Fundamentos de Oncología: Fundamentos de Oncología*. Dr. Efraín A. Medina Villaseñor. Recuperado el 12 de marzo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=b3eAAgAAQBAJ>
- Martínez-Salgado C. (2012). El muestreo en investigación cualitativa. Principios básicos y algunas controversias. *Cien Saude Colet.* 17(3):613-4. Recuperado el 2 de febrero de 2018 de <http://www.scielo.br/pdf/csc/v17n3/v17n3a06.pdf>
- Meyers, R. A. (2007). *Cancer. Wiley*. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=n__a1sG0EF4C
- Ministerio de Salud Pública. (2017). *Tratamiento del dolor oncológico en adultos*. Recuperado el 5 de febrero de 2018 de <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/Dolor-ncol%C3%B3gicoGPC-final-12-12-2016-1.pdf>
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). *Nonsmall cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. In Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 83, pp. 584–594). Elsevier. Recuperado el 23 de marzo de 2017 de <https://doi.org/10.4065/83.5.584>
- Moreno, A. P. R., Bruges, R. E., Arboleda, A. C., & García, L. F. J. (2017). Regulación epigenética en cáncer de pulmón: implicaciones para el clínico. *Universitas Médica*, 57(3), 332–347. Recuperado el 15 de abril de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231048178005>

- Muñoz, S. P., & Pérez, S. C. (2007). *Cáncer de pulmón no microcítico*. Arán Ediciones. Recuperado el 12 de febrero de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=-cj7R27wnh8C>
- Nakanishi, Y., Shiraha, H., Nishina, S., Tanaka, S., Matsubara, M., Horiguchi, S., Kuwaki, K., others. (2011). *Loss of runt-related transcription factor 3 expression leads hepatocellular carcinoma cells to escape apoptosis*. *BMC Cancer*, 11(1), 3. Recuperado el 13 de marzo de <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-3>
- OMS. (2015). *Cáncer*. Recuperado el 12 de marzo de 2017 de <http://www.who.int/medicacentre/factsheets/fs297/es/>
- Orsini, J. A. (2000). *Manual de urgencias en la clínica equina: tratamientos y técnicas*. ELSEVIER ESPAÑA. Recuperado el 24 de marzo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=AsnPZ0PwC3kC>
- Parente Lamelas, I., Abal Arca, J., Jesús García García, M., Manuel García Pazos, J., Acuña Fernández, A., & Marcos Velázquez, P. (2011). *Cáncer de pulmón en mujeres, comparativo con hombres: análisis de los casos diagnosticados en el Complejo Hospitalario de Ourense entre 1999 y 2006*. Recuperado el 17 de diciembre de <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2010.10.008>
- Ramírez, P. A., Salazar, M. S., Castillo, P. C., & Montoya, I. Z. (s.f.). *COMPARACIÓN DE 3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA*. Recuperado el 7 de febrero de 2017 de http://abj.org.co/images/revistas/vol_41/Pag.%2018-22%20Comparaci%C3%B3n%20de%203%20m%C3%A9todos%20de%20extracci%C3%B3n%20de%20DNA%20de%20tejidos%20embebidos%20en%20parafina.pdf
- Raposo, C. G., de Castro Carpeño, J., & Barón, M. G. (2007). *Factores etiológicos del cáncer de pulmón: fumador activo, fumador pasivo, carcinógenos medioambientales y factores genéticos*. *Medicina Clínica*, 128(10), 390–396. Recuperado el 5 de febrero de 2017 de [10.1157/13099973](https://doi.org/10.1157/13099973)

- Romero Moratalla, G., Romero Moratalla, A., Moratalla Sosa, M., & Hidalgo Aparicio, Y. (2016). Supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimioterapia. *MULTIMED Revista Médica Granma*, 20(4), 797- 809. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de <http://www.revmultimed.sld.cu/index.php/mtm/article/view/276/351>
- Rojas Moreno, A. P., Bruges, R. E., Cañas Arboleda, A., & Jaramillo, L. F. (2016). Regulación epigenética en cáncer de pulmón: implicaciones para el clínico. *Universitas Médica*, 57(3). Rrecuperado el 7 de febrero de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231048178005>
- Ruano-Ravina, A., Fernández-Villar, A., & Barros-Dios, J. M. (2017). Radón residencial y riesgo de cáncer de pulmón en nunca fumadores. *Archivos de Bronconeumología*, 53(9), 475–476. Recuperado el 6 de febrero de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.01.004>
- Rodriguez, M. A., Álvarez, A. G., & Reséndiz, L. (2015). *Medicina general: Diagnóstico en oncología*. Barcelona – España: Elsevier. Recuperado el 26 de marzo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?isbn=8490227772>
- Saldías, F., Díaz, J. C., Rain, C., Illanes, P., Díaz, R., & Díaz, O. (2016). Detección precoz de cáncer pulmonar con tomografía computarizada de tórax en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica tabáquica. *Revista Médica de Chile*, 144(2), 202–210. Recuperado el 8 de febrero de 2018 de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v144n2/art09.pdf>
- Saldías Peñafiel, F., Elola Aránguiz, J. M., Uribe Monasterio, J., Morales Soto, A., & Díaz Patiño, O. (2016). Predictores clínicos y funcionales del riesgo de cáncer pulmonar en el seguimiento de una cohorte de adultos fumadores. *Revista Médica de Chile*, 144(11), 1382–1390. Recuperado el 8 de febrero de 2018 de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872016001100003
- Salud, O. M. (2013). *¿El tabaco y la humanidad van de la mano?* Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), Ecuador. Recuperado el 7

de febrero de 2017 de
[http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=939: mayo-31-2013&Itemid=356](http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=939:mayo-31-2013&Itemid=356)

Satiroglu-Tufan, N. L., Bir, F., & Duzcan, E. (2004). *Rapid and effective DNA amplification by polymerase chain reaction directly from paraffin-embedded tissue*. *Aegean Pathol. J*, 1, 33–38. Recuperado el 26 de enero de 2018 de http://www.turkjpath.org/pdf/pdf_APJ_659.pdf

Sato, K., Tomizawa, Y., Iijima, H., Saito, R., Ishizuka, T., Nakajima, T., & Mori, M. (2006). *Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer*. *Oncology Reports*, 15(1), 129–135. Recuperado el 5 de febrero de 2018 de <https://doi.org/10.3892/or.15.1.129>

Shen, L., Guo, Y., Chen, X., Ahmed, S., & Issa, J.-P. (2007). *Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis*. *BioTechniques*, 42(1), 48–58. Recuperado el 29 de enero de 2018 de <https://doi.org/10.2144/000112312>

Shiraha, H., Nishina, S., & Yamamoto, K. (2011). *Loss of runt-related transcription factor 3 causes development and progression of hepatocellular carcinoma*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(3), 745–749. Recuperado el 24 de marzo de 2017 de <https://doi.org/10.1002/jcb.22973>

Smith, E., Bianco-Miotto, T., Drew, P., & Watson, D. (2003). *Method for optimizing methylation-specific PCR*. *Biotechniques*, 35(1), 32–33. Recuperado el 2 de febrero de 2018 de https://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/03351bm01_11447a.pdf

Solidoro Santisteban, A. (2006). *Cáncer en el siglo XXI*. *Acta Médica Peruana*, 23(2), 112–118. Recuperado el 20 de noviembre de 2016 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172006000200011

- Travis, W. D. (2011). *Pathology of Lung Cancer. Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 669–692. Recuperado el 20 de abril de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.005>
- Tost, J. (Ed.). (2009). *DNA Methylation (Vol. 507). Totowa, NJ: Humana Press*. Recuperado 23 de abril de 2017 de <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-522-0>
- Tume, L. F. (2015). Modificaciones epigeneticasy microARNs en el diagnóstico y terapia del cáncer de pulmón. *Rev Venez Oncol*;27(2):119-130.
- Van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A., & De Ruyscher, D. K. (2011). *Small-cell lung cancer. The Lancet*, 378(9804), 1741–1755. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60165-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60165-7)
- Varela, A. S. (2002). *El Cáncer: Etiología, Epidemiología, Diagnostico y Prevencion*. Elsevier. Recuperado el 12 de marzo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=miybptbrsM8C>
- Villalba Caloca, J., & Martínez Heredero, R. (2004). Frecuencia del carcinoma broncopulmonar en pacientes fumadores y no fumadores diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en el año 2001. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 27–34. Recuperado el 6 de febrero de 2018 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000100005
- Viñes, J. J. (2007). La efectividad de la detección precoz de las enfermedades. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra (Vol. 30, pp. 11–27)*. SciELO España. Recuperado el 6 de febrero de 2018 de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000100002
- Warth, A., Muley, T., Meister, M., Stenzinger, A., Thomas, M., Schirmacher, P., Weichert, W. (2012). *The Novel Histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification System of Lung Adenocarcinoma Is a*

Stage-Independent Predictor of Survival. Journal of Clinical Oncology, 30(13), 1438–1446. Recuperado el 12 de abril de 2017 de <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.2185>

Weinberg, R. (2013). *The Biology of Cancer, Second Edition*. Taylor & Francis Group. Recuperado el 17 de marzo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=MzMmAgAAQBAJ>

World Health Organization and International Union against Cancer. (2005). Acción mundial contra el cáncer ¡ahora!. Ginebra: Organización Mundial de la Salud: Unión Internacional contra el Cáncer. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf>

Yanagawa, N., Tamura, G., Oizumi, H., Endoh, M., Sadahiro, M., & Motoyama, T. (2011). *Inverse correlation between EGFR mutation and FHIT, RASSF1A and RUNX3 methylation in lung adenocarcinoma: relation with smoking status. Anticancer Research*, 31(4), 1211–1214. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de <http://ar.iijournals.org/content/31/4/1211.long>

Zuo, J., Xia, J., Ju, F., Yan, J., Zhu, A., Jin, S., Zhou, H. (2013). *MicroRNA148a can regulate runt-related transcription factor 3 gene expression via modulation of DNA methyltransferase 1 in gastric cancer. Molecules and Cells*, 35(4), 313–319. Recuperado el 22 de marzo de 2017 de <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2314-9>

ANEXOS

Anexo 1. Obtención de los cortes de tejido embebidos en parafina por parte del personal de la unidad de anatomía patológica del hospital con el uso del micrótomos Thermo Shandon Finesse ME.



Anexo 2. Datos clínico patológicos de los pacientes seleccionados para el estudio que fueron diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, en el año 2016.

#	EDAD (años)	SEXO	FUMADOR	ESTADIO
1	64	Masculino	SI	2
2	55	Femenino	SI	2
3	69	Femenino	NO	1
4	64	Femenino	SI	2
5	66	Masculino	SI	4
6	71	Masculino	SI	2
7	73	Femenino	NO	2
8	61	Femenino	SI	1
9	71	Femenino	NO	4
10	76	Masculino	NO	2
11	61	Femenino	SI	3
12	65	Femenino	SI	2
13	55	Masculino	SI	2
14	56	Femenino	NO	3
15	80	Masculino	NO	1
16	54	Masculino	SI	3
17	81	Masculino	SI	3
18	74	Femenino	SI	3
19	81	Masculino	NO	1
20	78	Femenino	SI	2
21	72	Femenino	NO	4
22	83	Masculino	SI	2
23	59	Femenino	SI	4
24	42	Masculino	NO	1
25	41	Femenino	SI	4
26	56	Femenino	SI	2
27	85	Femenino	SI	1

28	66	Masculino	NO	1
29	74	Femenino	NO	3
30	59	Femenino	SI	2
31	59	Masculino	NO	3
32	41	Femenino	SI	3
33	60	Masculino	SI	1
34	65	Masculino	SI	2
35	84	Femenino	SI	2
36	61	Femenino	NO	1
37	79	Masculino	NO	4
38	72	Femenino	SI	4
39	39	Masculino	SI	3
40	63	Masculino	NO	2
41	78	Femenino	SI	4
42	61	Masculino	SI	3
43	67	Femenino	SI	1
44	70	Masculino	NO	2
45	49	Femenino	SI	4

Nota: Datos personales del paciente como su edad, sexo y su historial clínico de fumado en donde se detalla dos posibilidades (Si – No) y se ha establecido como fumador a todas aquellas personas que a lo largo de su vida han consumido al menos un cigarrillo. Finalmente se encuentra el estadio de cáncer en el que fue diagnosticado el paciente.

Anexo 3. Aprobación por parte del Comité de Bioética para la Investigación de la Universidad de las Américas



D. M. Quito, 17 de marzo de 2017

Señoritas
Daniela Estefanía Corrales Aguilar
Michelle Elizabeth Sambache Flores
Estudiantes

De mis consideraciones:

Por medio de la presente el Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de Las Américas le informa que el protocolo y los instrumentos de investigación del proyecto de titulación **"Estudio molecular del gen RUNX3 en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y su potencial uso como biomarcador oncológico"**, con fecha de hoy 17 de marzo de 2017, han sido aprobados por el Comité.

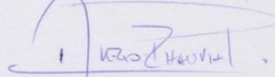
Esta aprobación, tiene una duración de un año, después del cual se debe pedir extensión si fuera necesaria.

En toda correspondencia con el Comité de Ética y Bioética para la investigación, favor referirse al siguiente código de aprobación: 2017-0303.

El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder tanto a los participantes como a la investigadora en relación a cualquier inquietud que pudiere surgir. Es importante remarcar que cualquier novedad debe ser comunicada al Comité; todo cambio en el protocolo de investigación implica que debe pedir una nueva aprobación al CEBE.

El Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de Las Américas ha otorgado esta probación con base en la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados. Los solicitantes de la aprobación son los responsables de aplicar y respetar la información, procedimientos y condiciones expresados en estos documentos aprobados por el Comité; también son responsables de respetar la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Atentamente,



Diego R. Chauvin P.
Presidente del CEBE-UDLA



