

## ÍNDEX

RESUM.....	2
RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	4
INTRODUCCIÓ .....	5
OBJECTIVES.....	10
METODOLOGIA.....	11
RESULTATS .....	13
MARCADORS EPIGENÈTICS.....	14
➤ <b>Metilació del DNA</b> .....	14
➤ <b>MicroRNA</b> .....	19
DISCUSSIÓ .....	22
CONCLUSIONS .....	27
SOSTENIBILITAT I ÈTICA.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	29

## RESUM

El càncer de pulmó és una de les causes de mortalitat arreu del món, degut a la seva agressivitat en estadis avançats, per això el que actualment es proposa és la detecció precoç i la prevenció d'aquesta patologia.

Actualment una de les tècniques utilitzades per la detecció dels tumors és la tomografia computeritzada de baixa dosis. Però aquesta tècnica té algunes limitacions, per aquest motiu s'estan buscant alternatives de diagnòstic que el puguin complementar.

En la detecció precoç es vol aconseguir un kit de marcadors moleculars relacionats amb el càncer de pulmó que es puguin diagnosticar en sang perifèrica. Aquesta detecció es podria realitzar amb una PCR convencional o PCR real-time de manera que això determinaria que tingués un baix cost, es pogués realitzar la prova amb relativament poc temps, i hi hagués possibilitat de repetir-ho sense repercussions en el pacient. La possibilitat d'aconseguir un mètode amb tots aquests avantatges és el que el converteix en una alternativa tan atractiva.

Fins al moment molts grups d'investigació han estat fent recerca amb aquesta possibilitat i s'ha trobat varies regions del genoma en sang perifèrica relacionades amb el càncer de pulmó. Els canvis epigenètics en el DNA (metilació aberrant del DNA i microRNA) són els que lideren fins al moment els marcadors moleculars estudiats en sang perifèrica de pacients de càncer de pulmó caucàsics.

La metilació aberrant en certs loci s'ha vist implicada en la carcinogènesi., Aquesta pot afectar a gens involucrats en el control del cicle cel·lular, la reparació del DNA, adhesió cel·lular, transducció de senyal, apoptosi i diferenciació. Els microRNA s'han vist involucrats en càncer de pulmó, aquests representen la part del genoma no codificant i es creu que aquests poden alterar l'expressió de certs gens.

L'objectiu d'aquesta estratègia és aconseguir una sèrie de marcadors que presentin una elevada sensibilitat i especificitat, de manera que representin una alta efectivitat a l'hora de diagnosticar aquesta patologia en un estadi precoç.

## RESUMEN

El càncer de pulmón es una de las causas de mortalidad en todo el mundo, debido a su agresividad en estadios avanzados, por eso lo que actualmente se propone es la detección precoz y la prevención de esta patología.

Actualmente una de las técnicas utilizadas para la detección de tumores es la tomografía computarizada de baja dosis. Pero esta técnica tiene algunas limitaciones, de ahí que se estén buscando alternativas de diagnóstico que puedan complementar.

En la detección precoz se quiere conseguir un kit de marcadores moleculares relacionados con el cáncer de pulmón que se puedan diagnosticar en sangre periférica. Esta detección se podría realizar con una PCR convencional o PCR real-time de modo que ello determinaría que tuviera un bajo coste, se pudiera realizar la prueba con relativamente poco tiempo, y hubiera posibilidad de repetirlo sin repercusiones en el paciente. La posibilidad de conseguir un método con todas estas ventajas es lo que lo convierte en una alternativa tan atractiva.

Hasta el momento muchos grupos de investigación han estado estudiando esta posibilidad y ha encontrado varias regiones del genoma en sangre periférica relacionadas con el cáncer de pulmón. Los cambios epigenéticos en el ADN (metilación aberrante del ADN y microRNA) son los que lideran hasta el momento los marcadores moleculares estudiados en sangre periférica de pacientes de cáncer de pulmón caucásicos.

La metilación aberrante en ciertos loci se ha visto implicada en la carcinogénesis. Esta puede afectar a genes involucrados en el control del ciclo celular, la reparación del ADN, adhesión celular, transducción de señal, apoptosis y diferenciación. Los microRNA se han visto involucrados en cáncer de pulmón, estos representan la parte del genoma no codificante y se cree que estos pueden alterar la expresión de ciertos genes. El objetivo de esta estrategia es conseguir una serie de marcadores que presenten una elevada sensibilidad y especificidad, de modo que representen una alta efectividad a la hora de diagnosticar esta patología en un estadio precoz.

## ABSTRACT

Lung cancer is one of the causes of death around the world, because of its aggressiveness in advanced stages, so investigators proposed early detection and prevention of this disease.

Currently, one of the techniques used to tumor detection is the low dose computed tomography, but it has some limitations, which is why they are looking for alternatives that can complement the diagnostic.

The objective is to reach a kit of biomarkers associated with lung cancer that can be diagnosed in peripheral blood. This detection could be realized with conventional PCR or real-time PCR, it could determine a low cost technique, could perform the test with relatively short time and there was the possibility of repeating without impact on the patient. The possibility of achieving a method with all of these advantages is what makes it so attractive alternative.

So far many research groups have been studying this possibility and they found several regions of the genome in peripheral blood related to lung cancer. Epigenetic changes in DNA (aberrant DNA methylation and microRNA) are leading the molecular markers studied in peripheral blood of Caucasian patients with lung cancer.

The aberrant methylation in certain loci has been implicated in carcinogenesis. This may affect genes involved in cell cycle control, DNA repair, cell adhesion, signal transduction, apoptosis and differentiation. MicroRNAs also have been involved in lung cancer, and represent non-coding part of the genome; these molecules may alter the expression of certain genes.

The objective of this strategy is to reach sets of biomarkers that display a high sensitivity and specificity, which have high effectiveness in diagnosing this disease in an early stage.

## INTRODUCCIÓ

Els organismes estan formats per cèl·lules que són les unitats morfològiques i funcionals dels éssers vius. En el desenvolupament de l'individu les cèl·lules proliferen, augmenten de mida i es diferencien formant estirps cel·lulars.

Aquestes cèl·lules es divideixen periòdicament i de forma regular amb la finalitat de reemplaçar les cèl·lules envellides o mortes, i d'aquesta manera poder mantenir la integritat i assegurar un bon funcionament dels diferents òrgans.

La divisió d'aquestes cèl·lules ve regulat per l'expressió gènica, aquesta determina a partir de mecanismes de control quan cal que la cèl·lula es divideixi i quan s'ha de mantenir estable. Quan s'altera l'expressió gènica per mutacions en el genoma s'inicia una divisió descontrolada que amb el temps donarà un tumor o un nòdul, donant el que anomenem càncer.

Hi ha diferents tipus de càncers depenent de l'origen del tumor o nòdul. Aquest tumors inicials poden desencadenar metàstasi si les cèl·lules del tumor es desprenen i es desplacen a altres àrees del cos a través del torrent sanguini o els vasos limfàtics. En aquesta revisió ens centrarem en el que s'origina en el pulmó (Hoffman et al., 2000)..

En aquesta malaltia, igual que en els càncers originats en altres localitzacions s'ha establert un sistema de classificació anomenat TNM que permet estadificar el càncer (González et al., 2012). Les sigles TNM fan referència a tres aspectes del càncer: la T es refereix a la mida i localització del tumor, la N a l'afectació dels ganglis limfàtics i la M a l'afectació o no d'altres òrgans (Ferlay et al., 2013). En la classificació TNM, distingim estadis inicials (I i II) en que el tumor es troba únicament en una zona concreta i es possible d'extirpar, i a mesura que va arribant a estadis més avançats, la carcinogènesi comença a afectar altres zones del pulmó o fins i tot del cos a través del torrent sanguini, i cada vegada és més difícil acudir a la cirurgia (González et al., 2012).

Hi ha diferents tipus de càncer depenent de la seva histologia. Cada subgrup histològic té una evolució natural diferent i per tant un possible tractament. Els dos subgrups

histològics més freqüents en el càncer de pulmó són l'adenocarcinoma i el carcinoma epidermoide que representen al grup de carcinoma no microcític<sup>1</sup>. Dins d'aquest grup també trobem el càncer de cèl·lules grans, el menys freqüent entre aquests tres. Representant un 20% dels càncers de pulmó, també es troba el carcinoma microcític<sup>2</sup>.

L'adenocarcinoma sol aparèixer en les zones més perifèriques dels pulmons, de manera que afecta generalment a la pleura i la paret toràcica. En canvi el carcinoma epidermoide es presenta més en les parts centrals del pulmó i té un creixement relativament lent (Hoffman et al., 2000).

El càncer de pulmó representa una de les causes principals de la mortalitat arreu del món (Boeri et al., 2011). Un dels problemes més preocupants en la cura d'aquesta malaltia és que no presenta símptomes fins que ja està en un estadi avançat. La taxa de supervivència de 5 anys és del 10% en malalts en estadis avançats, i en del 70% en malalts en estadi I de la malaltia. (Hoffman et al., 2000). Això significa que tot i tenir bons tractaments a l'abast és molt difícil poder controlar aquesta patologia. Per aquest motiu la recerca mèdica s'està decantant cap a la detecció precoç i la prevenció, amb la finalitat de millorar les possibilitats de supervivència.

Els factors ambientals i l'estil de vida juguen un paper molt important en el risc que presenta aquesta malaltia. El tabaquisme és un dels factors més desfavorables, essent present en el 90% dels pacients de càncer de pulmó. També intervenen altres factors de risc com la radioteràpia, la fibrosis pulmonar, la infecció per VIH, alguns tòxics ambientals i determinats factors genètics (Ferlay et al., 2013).

En la detecció prematura del càncer de pulmó s'utilitza la tomografia computeritzada per detectar possibles tumors, que és basa en l'obtenció d'imatges detallades a partir d'un equip de raigs X (Aberle DR et al., 2011).

Els resultats de l'estudi de "National Lung Screening Trial" han estat els primers en mostrar una major supervivència en pacients diagnosticats mitjançant tomografia

---

<sup>1</sup> En els articles científics el denominen; non small cells lung cancer (NSCLC). Aquest grup representa el 80% del càncer de pulmó

<sup>2</sup> En els articles científics el denominen small cells lung cancer (SCLC).

computeritzada de baixa dosis enfront la radiografia de tòrax. En el “National Lung Screening Trial” es va demostrar que utilitzant la tomografia computeritzada de baixa dosis (LD-CT) es reduïa un 20% la mortalitat en càncer de pulmó gràcies a la detecció prematura. (Aberle DR et al., 2011). El LD-CT té algunes limitacions, aproximadament el 20% dels càncers són sobrediagnosticats amb aquesta tècnica, el que deriva a un sobretractament d'aquesta patologia (Maldonado et al., 2015).

Una alternativa a aquestes limitacions podrien ser la detecció de marcadors moleculars a partir de mètodes no invasius de baix cost. El càncer es produeix a partir d'alteracions en el DNA. Aquestes alteracions del DNA produeixen mutacions que li confereixen a la cèl·lula millor capacitat de dividir-se i immortalitat, però si acumula moltes mutacions pot arribar a morir. Per això detectar la presència o absència de mutacions relacionades amb el càncer de pulmó, a partir de marcadors moleculars, podria ésser una bona opció juntament amb la CT de baixa dosis (Aberle DR et al., 2011).

Els marcadors moleculars que es voldrien utilitzar poden ser de dos tipus; en línia germinal, que es transmeten de generació en generació, o somàtiques. En el càncer de pulmó les mutacions més freqüents solen ser les induïdes ja que les espontànies solen representar una part gairebé inapreciable. Les mutacions espontànies corresponen a errors en la replicació, transcripció o transducció del DNA. En canvi les mutacions induïdes són generades normalment per agents carcinògens, en aquest tipus de càncer l'agent mutagènic principal és el tabac, però també hi poden intervenir altres agents representants dels factors de risc.

Els polimorfismes que es troben en línia germinal són les que són hereditàries i que es poden transmetre de pares a fills, aquestes estan presents en el DNA de les cèl·lules germinals per tant estan presents des del moment que es produeix l'embrió fins que la persona mor (Hoffman et al, 2000).

En alguns estudis, s'ha vist que la metilació aberrant de certes regions del DNA podrien veure's implicades en el procés de carcinogènesis, també s'ha vist implicats microRNA.

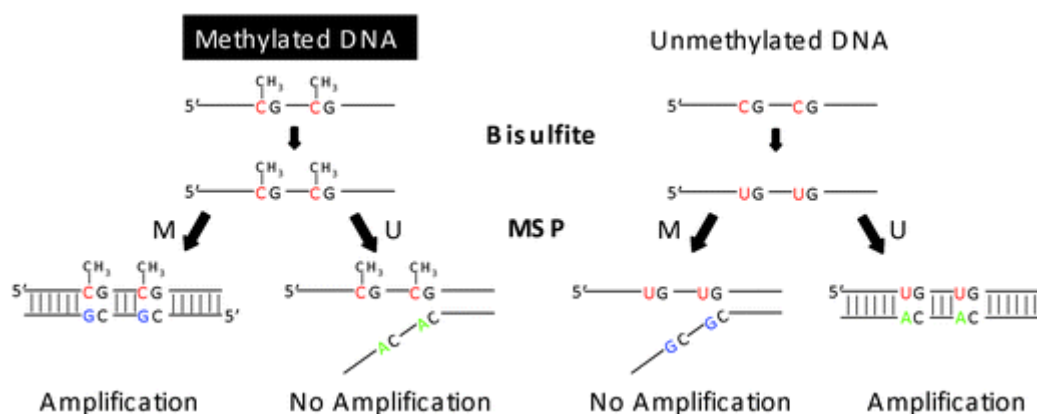
Els canvis epigenètics, com per exemple la metilació del DNA, són unes de les alteracions del DNA més comunes en el càncer d'humans. La metilació té un paper fonamental en els processos biològics, és un mecanisme epigenètic encarregat de l'expressió gènica i la metilació aberrant del DNA en certs loci s'ha vist implicada en la carcinogènesis. Aquesta es considera un canvi epigenètic, en el que s'addiciona un grup metil a una guanina que es precedida d'una citosina (CpG dinucleotides). També s'ha demostrat que aquesta metilació es pot trobar en DNA present a la sang perifèrica entre d'altres fluids corporals.(Zhang et al., 2011). Varis gens supressors de tumors contenen illes CpG en els seus promotors, i algunes d'elles presenten evidència de silenciament -per la metilació. La metilació aberrant dels promotors poden afectar a gens involucrats en el control del cicle cel·lular, la reparació del DNA, adhesió cel·lular, transducció de senyal, apoptosi i diferenciació cel·lular(Hu et al., 2008). El tabac està involucrat en desenvolupament de càncer a partir de la inducció de canvis en el patró de metilació del DNA.

D'altra banda, els microRNA, representants també del grup de marcadors epigenètics, tot i que són molt poc coneguts s'ha vist que l'expressió dels miRNA podrien utilitzar-se per classificar els càncers humans. La pèrdua i guany de funció dels microRNA s'ha demostrat que en alguns estudis que són implicats en l'origen de diversos tipus de càncer(Hu et al., 2008).

Per la detecció d'hipermetilació en les illes CpG s'utilitza la PCR de metilació específica (MSP). La capacitat de la tècnica MSP per diferenciar DNA metilat, de DNA no metilat, depèn del tractament amb bisulfit de sodi. El tractament amb bisulfit de sodi modifica les cadenes de DNA no metilades canviant les citosines per uracils, en canvi en les cadenes que estan metilades el bisulfit reté la metilació (Herman et al., 1996). Aquesta modificació de la cadena de DNA permet que es pugui establir una diferència entre cadenes que serà detectada amb els encebadors. Per tant s'utilitzaran encebadors per a les cadenes metilades (M) i encebadors per les cadenes no metilades (U), tal i com s'indica amb Figura 1. Si aquesta metilació es vol quantificar aleshores s'ha d'utilitzar la qMSP, que és la tècnica MSP modificada, que la única diferència que hi ha és que enlloc d'utilitzar una PCR convencional, s'utilitza una PCR quantitativa (real-time).



Aquesta modificació de la cadena de DNA permet que es pugui establir una diferència entre cadenes que serà detectada amb els marcadors. Per tant s'utilitzaran encebadors per a les cadenes metilades (M) i encebadors per les cadenes no metilades (U), tal i com s'indica amb Figura 1.



**Figura 1.** Base científica de la PCR de metilació específica

Per detectar l'expressió dels microRNA s'utilitza la PCR quantitativa però sense tractar les mostres amb bisulfit. En la PCR quantitativa o real-time a diferència de la PCR convencional s'utilitza un termociclador amb sensors que permeten mesurar la fluorescència emesa per una sonda fluorescent. La PCR quantitativa consta de dues fases principals; la d'hibridació, en que la sonda i els primers s'uneixen al DNA a amplificar i la d'extensió, en que la sonda s'escindeix i s'allibera el fluorocrom que es percep per els sensors del termociclador (Herman et al., 1996).

## OBJECTIVES

The main objective of this study is to perform a bibliographic research on lung cancer genetic polymorphisms that can be detected in circulating DNA in peripheral blood and the possible interaction between them as a risk factor for lung cancer development.

In order to perform the main objective, the secondary objectives are:

- Realize a bibliographic research in databases related to medicine or genetics
- Mark inclusion and exclusion criteria for the selection of literature.
- Analyze the results of the different studies and discuss which ones could be good biomarkers.

## METODOLOGIA

En l'elaboració d'aquest projecte s'ha realitzat una recerca bibliogràfica en les bases de dades Pubmed i Google acadèmic. Per aconseguir els articles amb el text complet s'ha utilitzat el cercador + de la biblioteca de la Udg.

Paraules clau utilitzades: "Lung" and "cancer" and ["biomarker" or "polymorphism"] and ["blood" or "serum" or "plasma"].

Els criteris d'inclusió utilitzats han estat els següents:

- Articles publicats entre el 2000 i el 2015
- Anàlisi de marcadors en sang perifèrica
- Estudis realitzats amb població caucàsica
- Estudis amb controls (persones sanes) i casos (pacients amb càncer de pulmó)
- Bibliografia d'articles de revisió i articles de metanàlisi

Els criteris d'exclusió utilitzats han estat els següents:

- Articles que no considerin els paràmetres de sensibilitat i especificitat dels marcadors.
- Estudis que no compleixen els criteris d'inclusió

La metodologia que s'ha seguit per a realitzar aquest estudi és la següent:

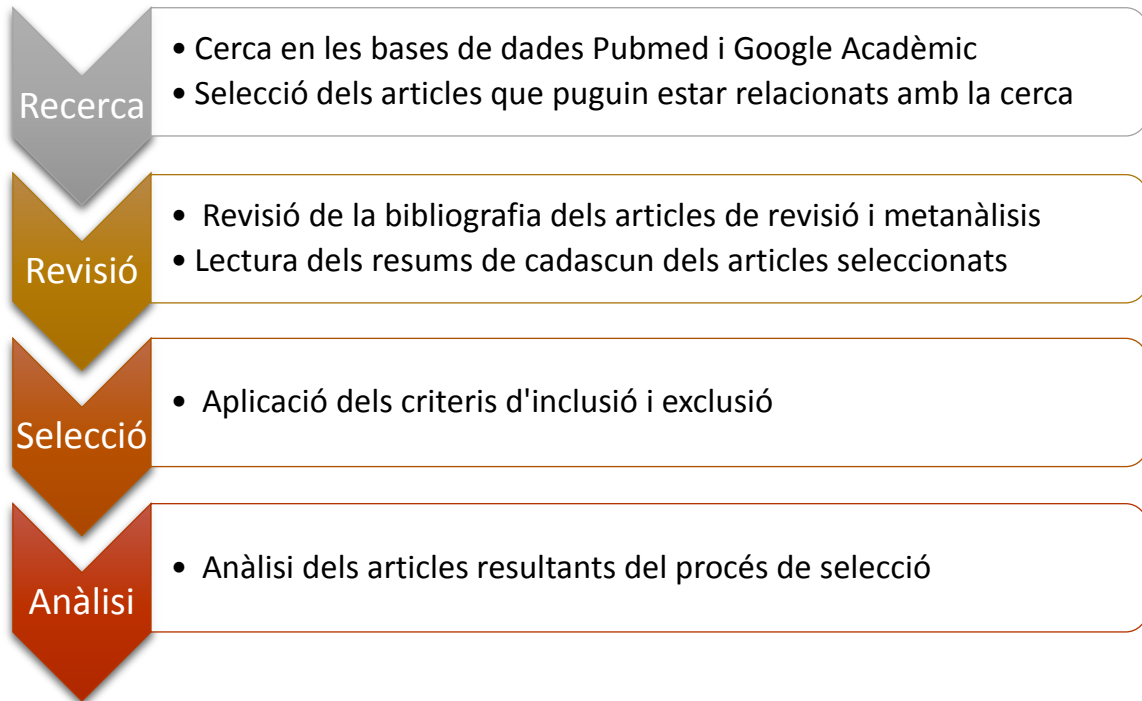


Figura 2. Metodologia emprada per a realitzar l'anàlisi bibliogràfic.

## RESULTATS

En la fase de recerca s'han seleccionat 48 articles entre la cerca en les bases de dades i la revisió de la bibliografia dels articles de revisió i metanàlisis. Al aplicar els criteris d'inclusió i exclusió resulten 5 articles; 3 articles de marcadors de metilació i 2 articles de marcadors microRNA.



**Figura 3.** Resultats obtinguts en la recerca d'articles segons la metodologia utilitzada.

En cadascun d'aquests articles s'ha analitzat un o varis marcadors per determinar la seva eficàcia a l'hora de determinar el risc de càncer de pulmó i la seva detecció precoç.

En alguns dels estudis han provat d'utilitzar sets de marcadors tant canvis epigenètics com microRNA per provar la seva especificitat i sensibilitat com a test de sang perifèrica per la detecció de càncer de pulmó.

## MARCADORS EPIGENÈTICS

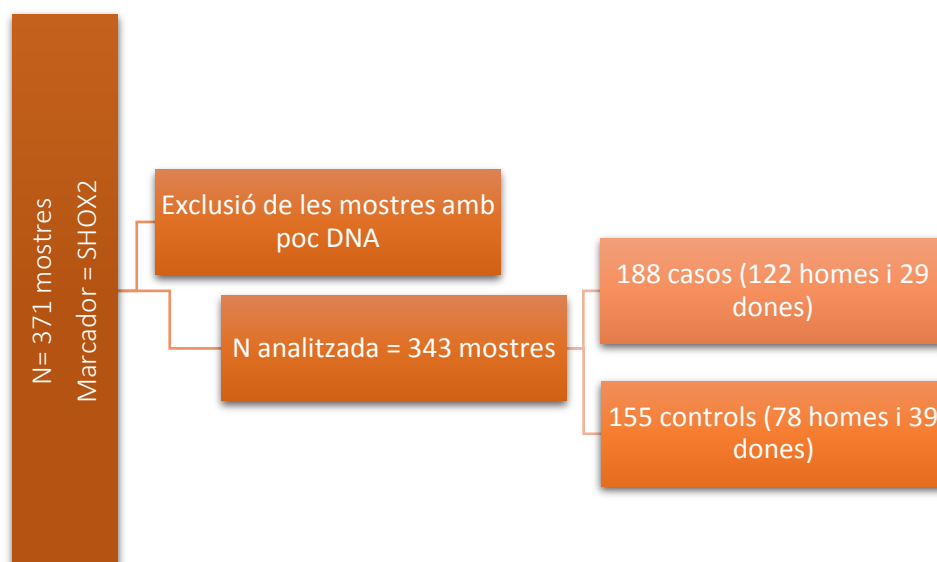
A continuació es descriuran els articles resultants de la recerca bibliogràfica. Es diferenciarà entre articles d'estudis de metilació del DNA i microRNA.

### ➤ Metilació del DNA

- SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma (Kneip et al., 2011)

En aquest projecte es va analitzar el marcador SHOX2, localitzat en el cromosoma 3q, en sang perifèrica en un cohort de 343 participants de població Caucàsica, específicament d'Alemanya, els quals es van distingir entre 188 casos i 155 controls (Figura 4), en el que s'observa un nombre reduït de dones entre els participants.

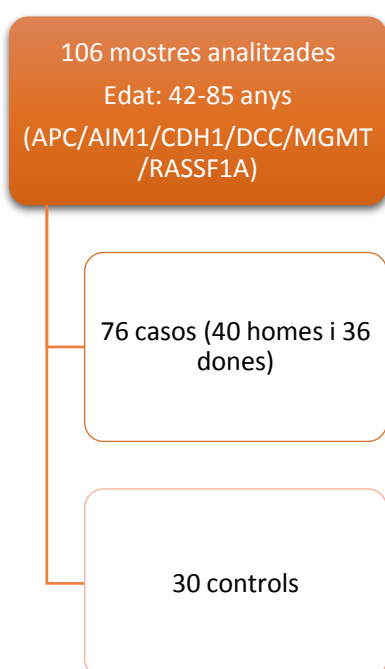
Per l'anàlisi de les mostres es va utilitzar PCR real-time per la detecció de metilació.



**Figura 4.** Cohort utilitzada en l'anàlisi del marcador SHOX2.

En els resultats obtinguts es va veure una clara diferència entre controls i casos. La metilació de SHOX2 en el DNA dels pacients amb càncer de pulmó va resultar ser molt més elevada que en els controls. A partir de l'anàlisi estadístic realitzat a partir de les curves ROC, es va determinar una sensibilitat del 60% i una especificitat del 90%.

- An epigenetic marker panel for detection of lung cancer using cell-free serum DNA (Begum et al., n.d.)



En aquest projecte després de fer un test de varis marcadors moleculars, es van seleccionar els marcadors epigenètics APC, AIM1, CDH1, DCC, MGT i RASSF1A per determinar la seva eficàcia per a la detecció precoç del càncer de pulmó. En aquest estudi es va analitzar els nivells de metilació d'aquests marcadors en una cohort de 106 participants, distingit en 76 casos i 30 controls que es trobaven entre 42 i 85 anys.

Per a dur a terme aquest anàlisi es va realitzar la tècnica de PCR quantitativa de metilació específica, en el que es va determinar la metilació de cadascun d'aquests marcadors.

**Figura 5.** Cohort utilitzat en aquest estudi

Entre els 76 casos, es van trobar metilació aberrant del promotor APC en 12 mostres, del AIM1 en 14 mostres, del CDH1 en 47 mostres, del DCC en 27 mostres, del MGMT en 13 mostres i del RASSF1A en 6 mostres.

La presència de metilació aberrant en els controls va ésser relativament baixa, el que va determinar que tot i tenir una baixa sensibilitat en la majoria dels marcadors, l'especificat era alta, essent l'especificitat mínima del 70% i la màxima del 100% (Taula 1).

També es va analitzar la probabilitat de trobar metilació aberrant en un d'aquests 6 promotors (APC, AIM1, CDH1, DCC, MGMT, RASSF1A) quan s'analitzen junts. La sensibilitat va augmentar però disminuïa considerablement l'especificitat (Taula 1).

GEN/S	Sensibilitat	Especificitat
CDH1	62%	70%
DCC	35,5%	100%
APC	15,8%	90%
AIM1	18,4%	96,7%
MGMT	17,1	96,7%
RASSF1A	8%	96,7%
Test de combinació APC, AIM1, CDH1, DCC, MGMT, RASSF1A	84,2%	56,7%

**Taula 1.** Sensibilitat i especificitat per els gens amb metilació aberrant analitzats en aquest estudi.

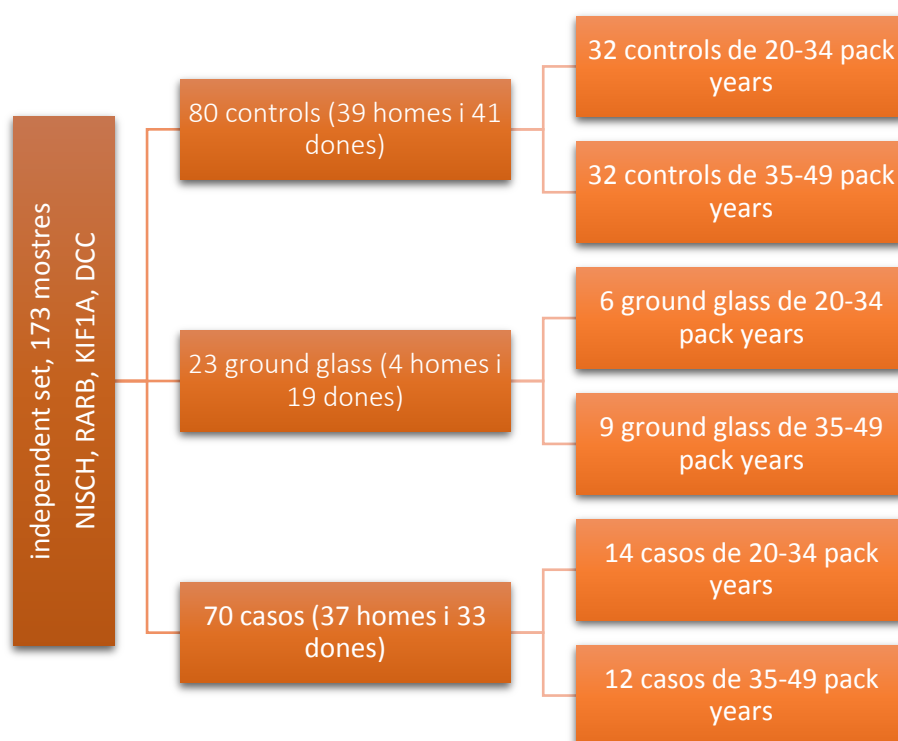
- [Molecular Analysis of Plasma DNA for the Early Detection of Lung Cancer by Quantitative Methylation-Specific PCR \(Laskie Ostrow et al., 2010\)](#)

En aquests projecte es va fer un anàlisi inicial (evaluation set) amb 5 marcadors (DCC, NISCH, RARB, KIF1A i b4GALT1) que es va veure en estudis anteriors que eren



marcadors específics de càncer de pulmó en teixit, en excepció de DCC. El marcador b4GALT1 va esser descartat perquè presentava una baixa diferència entre casos i controls.

Es va realitzar l'anàlisi dels altres 4 marcadors (independent set) en un cohort de 173 participants, en el que es van distingir 3 grups; controls, casos i ground glass<sup>3</sup>. I també es va tenir en compte el consum de tabac amb la variable paquets-any. Els pacients més freqüents són els que es troben entre 25 i 40 paquets-any<sup>4</sup>, per això a focalitzarem la interpretació de resultats en els grups de 20-34 paquets any i de 35 a 49 paquets any.



**Figura 6.** Estructura del cohort utilitzat en l'estudi

Igual que en l'estudi anterior els marcadors per separat presentaven una baixa sensibilitat però una alta especificitat, per això es va tractar de realitzar un panell on els 4 marcadors fossin presents, el que feia augmentar la sensibilitat i no feia disminuir excessivament la especificitat (Taula 2).

<sup>3</sup> En el grup ground glass s'hi consideren tots els pacients que presenten una taca en el "TAC" però que encara no es pot considerar cas ja que té una mida relativament petita i fa poc temps que hi és.

<sup>4</sup> Paquets-any, és la unitat de mesura per la quantitat de cigarrets que una persona ha fumats durant un període de temps que s'obté a partir de la relació entre els cigarrets per dia pels anys que ha estat fumant, tenint en compte els temps d'abstinència en aquest període de temps.

Quan es relacionen les variables metilació amb consum de tabac s'observa que al augmentar el consum de tabac disminueix la sensibilitat i especificitat dels marcadors, que podria ésser degut a que la distribució de les mostres és heterogènia i alguns mostrals són relativament petits.

GEN/S	Sensibilitat	Especificitat
KIF1A	18%	98,8%
DCC	25,4%	95%
RARB	16%	96,3%
NISCH	41%	75%
KIF1A, DCC, RARB, NISCH	73%	71%

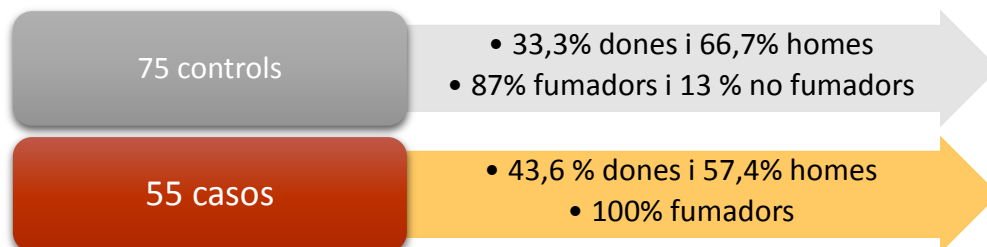
**Taula 2.** Sensibilitat i especificitat per els gens amb metilació aberrant analitzats en aquest estudi.

➤ *microRNA*

- Serum microRNA Biomarkers for Detection of Non-Small Cell Lung Cancer(Hennessey et al., 2012)

En aquest projecte es va fer un anàlisi inicial (training set) amb 328 miRNA, dels quals se'n van seleccionar 181 per a un anàlisi posterior, dels quals es van seleccionar únicament 25 miRNA per l'anàlisi final (test set). En l'anàlisi final es va utilitzar un cohort de 130 participants, dels quals 75 eren casos i 55 controls (Figura 8). En aquest últim anàlisi es van seleccionar únicament els parells de marcadors que tenien una sensibilitat i especificitat per sobre del 75%.

La tècnica utilitzada va ésser PCR real time de metilació específica (qMSP).



**Figura 8.** Cohort utilitzat en l'estudi.

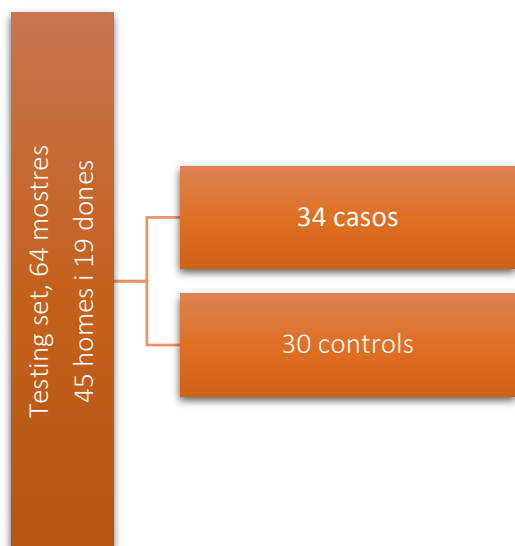
Es van combinar finalment en 5 parells de marcadors, miR-301 i miR-27b, miR-15b i miR-301, miR-142-3p i miR-27b, miR-15a i miR-27b i miR-15b i miR-27b.

La sensibilitat i especificitat van semblar ser bastant altes per a totes les combinacions, tal i com s'indica a la taula 3.

GEN/S	Sensibilitat	Especificitat
miR-15b i miR-27b	100%	84%
miR-15a i miR-27b	94%	75%
miR-142-3p i miR-27b	87%	76%
miR-15b i miR-301	75%	93%
miR-301 i miR-27b	75%	76%

**Taula 3.** Sensibilitat i especificitat per els gens amb metilació aberrant analitzats en aquest estudi.

- A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer (Bianchi et al., 2011)



**Figura 9.** Cohort utilitzat en el testing set de l'estudi

En aquest estudi es van realitzar dos anàlisis (training set i testing set) amb un cohort de 64 participants en cada cas, però diferents participants en cada anàlisi. En el training set es va utilitzar un cohort de 25 casos i 39 controls i en el testing set es va utilitzar un cohort de 34 casos i 30 controls. L'estudi va ser igual en ambdós ja que es va utilitzar un set de 34 miRNA i

se'n va avaluar l'eficàcia per la detecció precoç del càncer de pulmó.

Per a dur a terme aquest anàlisi es va utilitzar la PCR real-time.

Tant en el primer anàlisi com en el segon, igual però amb diferents participants es va arribar a una especificitat i sensibilitat bastant elevada i semblant, essent 69% i 71% de sensibilitat i 84% i 90% d'especificitat.

## DISCUSSIÓ

En aquesta revisió bibliogràfica s'han determinat dos grups de marcadors epigenètics com a possibles candidats de tests en sang perifèrica, metilació del DNA en certes regions del genoma, i els patrons d'expressió de certs microRNA.

La metilació de SHOX2 a nivell global s'ha vist que té una alta especificitat i una bona sensibilitat. En l'estadi I del càncer de pulmó la sensibilitat de SHOX2 es veu reduïda (27%), en els estadis més avançats aquest presenta una sensibilitat més elevada, això podria ser un impediment per la utilitat d'aquests marcadors, de manera que els autors proposen que podria ser necessari l'ús de marcadors addicionals en la detecció primerenca (Kneip et al., 2011.). Tot i així els autors proposen que podria ser un bon marcador per a la millora del diagnòstic precoç en l'estadi II, ja que presenta una alta sensibilitat (72%). Aquest marcador ha estat estudiat amb altres tipus de mostres (teixit i broncoaspirat) en el que s'ha observat alta sensibilitat, per aquest motiu els autors proposen aquest marcador amb sang tot i que caldria fer nous estudis per tal de verificar els resultats i l'eficàcia d'aquest marcador.

En els altres dos estudis referents a la metilació en els que s'analitzen varis marcadors moleculars, s'observa una molt bona especificitat per cadascun dels marcadors seleccionats en solitari, però en la majoria de marcadors la sensibilitat no es veu gaire afavorida. Per aquest motiu, en alguns estudis s'ha proposat la identificació de marcadors en sèrum o plasma en un conjunt específic de gens ja que podria ser un enfocament potencialment útil per augmentar la sensibilitat i d'aquesta manera poder detectar pacients amb càncer de pulmó. (Begum et al., 2011).

CDH1, presenta una sensibilitat (62%) i especificitat (70%) moderada però relativament alta, enfront altres marcadors, per separat. Es va determinar a partir de l'eina estadística de regressió logística que CDH1 es presentava més en pacients amb tumors

més petits de 3 cm que en tumors més grans, aquesta relació no s'ha descobert a què es deguda, però pot ser útil per determinar càncers en fase molt primerenca. En l'estudi on s'analitzava CDH1, es va observar que CDH1 i APC sovint es presentaven junts i es va plantejar com una possible interacció entre aquests, tot i que s'haurien de realitzar estudis posteriors, ja que podria ser efecte de l'atzar en aquest projecte. (Begum et al., 2011)

La metilació de DCC va ser estudiada en dos estudis, la especificitat observada va resultar ser molt similar i elevada (95% i 100%), en canvi la sensibilitat tot i que es va presentar relativament baixa en ambdós estudis hi havia certa diferència (25,4% i 35,5%) (Begum et al., 2011.; Laskie Ostrow et al., 2010). Aquestes diferències es deuen segurament a la diversitat de les variables estudiades, al nombre de mostres, el disseny de l'estudi i la història clínica i demogràfica dels participants.

NISCH a diferència dels altres marcadors analitzats, té una sensibilitat relativament elevada, tot i que no arriba a estar al nivell de CDH1. Dins dels gens analitzats en aquest estudi és el que presenta més metilació en el control (25%) el que el fa menys específic per el càncer de pulmó (Laskie Ostrow et al., 2010).

Tots els marcadors de metilació analitzats i escollits presenten una especificitat alta, de manera que per poder assolir una bona sensibilitat, en dos estudis es va fer un anàlisi de la combinació de marcadors. En l'anàlisi de combinació l'objectiu és seleccionar varis marcadors moleculars que podrien estar relacionats amb el càncer de pulmó i analitzar-los junts en un test de marcadors. Aquest anàlisi sol millorar la sensibilitat però es sol perdre especificitat.

Pel que fa l'anàlisi de APC, AIM1, CDH1, DCC, MGMT i RASSF1A, els marcadors estudiats per separat presentaven una especificitat elevada (90% a 100%) però una sensibilitat bastant baixa (7.9% a 35.5%), en excepció del CDH1, al analitzar-los tots junts la

sensibilitat va augmentar considerablement (84.2%) però es va reduir molt la especificitat (56.7%) (Begum et al., 2011).

El mateix passava amb l'anàlisi de NISCH, KIF1A, DCC i RARB, inicialment per separat tenien unes sensibilitats molt baixes (16% a 28.4%) i una especificitat d'entre 98.8% i 96.7% , en excepció de NISCH, al realitzar l'anàlisi amb els 4 marcadors es va aconseguir augmentar la sensibilitat (71%), tot i que es va reduir la especificitat (73%), es presenta com un bon grup de marcadors genètics per el càncer de pulmó. En aquest estudi es va veure una relació distorsionada quan es relacionava la especificitat i sensibilitat dels marcadors amb l'hàbit de fumar, a més paquets anys, disminuïa la especificitat i sensibilitat, per a un bon marcador s'esperaria l'efecte contrari, ja que la exposició al tabac augmenta el risc de la malaltia(Laskie Ostrow et al., 2010). Aquests resultats es poden deure a la desviació de les dades, ja que no hi ha el mateix nombre de participants en cada grup de pacients.

En l'anàlisi de microRNA, es proposa directament la combinació de dos o més microRNA. En un dels estudis es proposa la quatre combinacions de dos parells de microRNA, aquestes 4 combinacions presenten una alta especificitat (93% a 75%) i sensibilitat (100 a 75%) i es presenten com una molt bona opció a l'hora de diagnosticar càncer de pulmó. MicroRNA 15b i microRNA 27b es podrien considerar els millors candidats d'entre aquest 4 parells proposats, ja que tenen una sensibilitat del 100% i una especificitat del 84%. Els marcadors miRNA utilitzats en aquest estudi van determinar-se en estudis anteriors en teixit tumoral(Hennessey et al., 2012).

En l'altre anàlisi de microRNA, es va determina un kit de 34miRNA en pacients asimptomàtics i pacients control, que es va analitzar dues vegades amb un cohort diferent i es va determinar una alta sensibilitat (71%, 69%) i especificitat (90%, 84%). En els estadis més avançats (II-VI) augmenta considerablement la sensibilitat (92% 83%) (Bianchi et al., 2011).



A partir d'aquests estudis alguns autors s'han plantejat la possibilitat de combinar els test de marcadors amb la tomografia computeritzada de baixa dosis (LD-CT) (Begum et al., n.d.; Kneip et al., n.d.). Ja que una de les limitacions més importants de la LD-CT és la seva baixa sensibilitat, i amb l'ajuda de tests de marcadors es podria superar aquesta problemàtica. Aquesta opció encara forma part d'una hipòtesi inicial que s'hauria de confirmar amb estudis posteriors. Alguns mètodes de diagnòstic s'ha determinat que tenen un increment de morbiditat i mortalitat, LD-CT per exemple pot donar falsos positius de manera que pot afectar a l'estat psicològic del pacient aportant-li un tractament innecessari que podria ser-li perjudicial, per això es necessita una alternativa (Kneip et al., 2011).

Els biomarcadors en combinació amb LD-CT, es podrien utilitzar en dos moments del diagnòstic. Es podrien utilitzar com a mètode inicial en persones sanes amb un alt risc de patir càncer de pulmó (fumadors, amb patologies respiratòries, d'edats avançades), de manera que en presència d'un resultat positiu es pogués realitzar posteriorment la tomografia computeritzada, per re-afirmar el diagnòstic. O d'altra banda es podria realitzar com a mètode secundari davant d'un pacient amb un resultat indeterminat en la tomografia computeritzada (Kneip et al., 2011).

Un impediment que podria suposar l'ús de marcadors en sang, és que el plasma sanguini conté una barreja de DNA que prové de qualsevol part del cos, i per tant els marcadors han d'ésser molt específics per el càncer de pulmó per poder assegurar l'efectivitat del test (Kneip et al., 2011). Per aquest motiu a l'hora de diagnosticar aquesta malaltia a partir de mostres de sang, és molt important l'especificitat del marcador, ja que si aquesta no representes un tant per cent elevat, es podria sobrediagnosticar la malaltia obtenint falsos positius.

Els resultats en diversos estudis amb l'ús dels mateixos marcadors poden variar degut al ús divers de les variables utilitzades (tipus de mostra, nombre de mostres, disseny de

l'estudi i història clínica i demogràfica dels participants) i les diverses tècniques de laboratori (Hennessey et al., 2012). Per aquest motiu per a poder arribar a un test de marcadors consensuat, s'hauria de realitzar varis estudis sobre els mateixos marcadors i arribar a conclusions similars. Actualment els marcadors en teixit estan molt estudiats en càncer de pulmó, però dels marcadors en sang per aquesta patologia encara queda molt per descobrir i investigar, ja que tots aquests resultats descrits, són resultats primaris, que encara s'han de confirmar.

## CONCLUSIONS

MicroRNA biomarkers reviewed in this study seems to be the best biomarkers for lung cancer early detection. miR-27b and mir15b have a high sensitivity (84%) and specificity, which make them very good candidates for early detection of this disease. In addition, the other microRNA biomarkers reviewed could also be good candidates.

Methylation biomarkers that have been reviewed have some limitations, some of them have an unexpected relationship with tobacco, some of them if analyzed alone have low sensitivity, and when analyzed together, their specificity decreases. They could be used as lung cancer biomarkers, but they are not as good as microRNA biomarkers mentioned previously in this analysis.

Blood biomarkers also can be combined with CT scan to reach a better diagnosis.

It is important to emphasize the fact that these biomarkers have not been accepted yet, and research on this topic must continue to obtain official markers for clinical diagnosis of lung cancer.

## SOSTENIBILITAT I ÈTICA

Aquesta recerca bibliogràfica té com a fi aconseguir una detecció precoç del càncer de pulmó així com poder determinar el risc de patir càncer del pacient tenint en compte l'anàlisi de marcadors en sang així com els hàbits de vida.

En l'àmbit ètic s'hauria de valorar si seria positiu saber si es té risc o no de patir càncer, en alguns casos potser si, si és una persona que té uns hàbits poc saludables, es podria reduir el risc de patir-lo, seguint un patró de vida saludable. En canvi una persona en el que el risc sigui pràcticament genètic, podria afectar al estat d'ànim de la persona, en el que potser viuria sempre amb la por de patir aquesta malaltia.

També cal tenir en compte que sabent si es té risc o no de patir càncer es podria seguir uns controls rutinaris i d'aquesta manera poder detectar la malaltia en un estadi precoç.

Analitzant la sostenibilitat seria important reduir aquest tipus d'anàlisis a un grup determinat de persones, ja que no seria viable realitzar aquest tipus de proves a tota la població. El grups de persones que podrien accedir a aquestes proves serien pacients amb antecedents familiars en aquesta malaltia, fumadors habituals i persones en contacte amb factors ocupacionals relacionats amb el càncer de pulmó, com amiant, radó, arsènic entre altres.

## BIBLIOGRAFIA

- Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, S. J. (2011). Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *The New England Journal of Medicine*, 365, 113–116. <http://doi.org/10.1056/NEJMp1415160>
- Begum, S., Brait, M., Dasgupta, S., Ostrow, K. L., Zahurak, M., Carvalho, A. L., Sidransky, D. (2011). An Epigenetic Marker Panel for Detection of Lung Cancer Using Cell-Free Serum DNA. *Imaging Diagnosis Prognosis Clin Cancer Res*, 17(13), 4494–503. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3436>
- Bianchi, F., Nicassio, F., Marzi, M., Belloni, E., Dall'olio, V., Bernard, L., ... Fiore, D. (2011). A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. <http://doi.org/10.1002/emmm.201100154>
- Boeri, M., Verri, C., Conte, D., Roz, L., Modena, P., Facchinetti, F., ... Sozzi, G. (2011). MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3713–3718. <http://doi.org/10.1073/pnas.1100048108>
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374–1403. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- González, A., Bruno, B., Salariato, G., Álvarez, O., Paganini, L. (2012). Actualización de la estadificación del cáncer de pulmón, 325–330.
- Hennessey, P. T., Sanford, T., Choudhary, A., Mydlarz, W. W., Brown, D., Adai, A. T., Tamas, A. (2012). Serum microRNA Biomarkers for Detection of Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*, 7(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0032307>
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, 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.

<http://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>

Hoffman, P. C., Mauer, A. M., & Vokes, E. E. (2000). Lung cancer. *Lancet (London, England)*, 355(9202), 479–85. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)82038-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)82038-3)

Hu, Z., Chen, J., Tian, T., & Zhou, X. (2008). Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival, 118(7). <http://doi.org/10.1172/JCI34934.2600>

Kneip, C., Schmidt, B., Seegebarth, A., Weickmann, S., Fleischhacker, M., Liebenberg, V., Dietrich, D. (2011). SHOX2 DNA Methylation Is a Biomarker for the Diagnosis of Lung Cancer in Plasma.

Laskie Ostrow, K., Hoque, M. O., Loyo, M., Brait, M., Greenberg, A., Siegfried, J. M., ... Sidransky, D. (2010). Molecular Analysis of Plasma DNA for the Early Detection of Lung Cancer by Quantitative Methylation-Specific PCR. *Imaging*. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3304>

Maldonado, F., Duan, F., Raghunath, S. M., Rajagopalan, S., Karwoski, R. A., Garg, K., ... Peikert, T. (2015). Noninvasive CT-Based Risk Stratification of Lung Adenocarcinomas in the National Lung Screening Trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192, 737–744. <http://doi.org/10.1164/rccm.201503-0443OC>

Zhang, Y., Wang, R., Song, H., Huang, G., Yi, J., Zheng, Y., Chen, L. (2011). Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 303(1), 21–28. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.12.011>