



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”**

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EGFR EN MUESTRAS DE LAVADO**  
**BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER**  
**PULMONAR**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

**BALTAZAR PECH ALONSO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. RAÚL JESÚS CICERO SABIDO

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD 406 DE NEUMOLOGÍA “DR. ALEJANDRO CELIS”

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, “DR. EDUARDO LICEAGA”

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. GABRIELA MERCADO CELIS INMEGEN

**CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa el esfuerzo de muchas personas, que día a día me alentaron a seguir adelante y alcanzar mis metas.

A mis padres, Cruz y Nicolás, por haberme dado el mejor regalo, que es la vida y haberme enseñado a ser humilde, agradecido e independiente, los amo.

A mis hermanos, que a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes en los mejores y peores momentos.

A mis dos razones de vivir, mi esposa Cruzilet y mi hija Yaretsi, porque sin su apoyo y esfuerzo, nada hubiera sido posible, gracias por estar en mi vida y ser mi aliento, las amo.

A todos mis maestros, que con cada una de sus enseñanzas lograron infundir en mí el sentido de la responsabilidad y pasión por mi trabajo.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen.</b>	
<b>2. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>3. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1. Cáncer pulmonar.....</b>	<b>4</b>
3.1.1. Etiopatogenia.....	6
3.1.2. Diagnóstico.....	7
3.1.3. Estadificación.....	9
3.1.4. Tratamiento.....	13
<b>3.2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).....</b>	<b>19</b>
3.3.1. ELISA directo.....	21
3.3.2. ELISA indirecto.....	21
3.3.3. ELISA sándwich.....	21
<b>4. Planteamiento del problema.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Justificación.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Pregunta de investigación.....</b>	<b>25</b>
<b>7. Hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<b>8. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
8.1. General.....	27
8.2. Secundarios.....	27
<b>9. Metodología.....</b>	<b>28</b>
9.1. Diseño de investigación.....	28
<b>10. Método de estudio.....</b>	<b>29</b>
<b>11. Obtención de la muestra.....</b>	<b>30</b>
11.1. Recolección de la muestra.....	30
11.2. Cálculo de la muestra.....	32
<b>12. Universo de estudio.....</b>	<b>33</b>
12.1. Proceso de reclutamiento.....	33
<b>13. Criterios de selección.....</b>	<b>34</b>

13.1.	Criterios de inclusión.....	34
13.1.1.	Criterios con diagnóstico de cáncer.....	34
13.1.2.	Criterios sin diagnóstico de cáncer.....	34
13.2.	Criterios de exclusión.....	35
13.3.	Criterios de eliminación.....	35
<b>14.</b>	<b>Ubicación del estudio.....</b>	<b>36</b>
<b>15.</b>	<b>Variables de estudio y caracterización.....</b>	<b>36</b>
15.1.	Variables independientes.....	36
15.2.	Variables dependientes.....	36
15.3.	Probables variables modificadoras del efecto.....	36
<b>16.</b>	<b>Descripción de procedimientos.....</b>	<b>38</b>
16.1.	Exámenes de laboratorio.....	38
16.2.	ELISA sándwich.....	38
16.2.1.	Extracción de proteínas.....	38
16.2.2.	Preparación de la placa.....	38
16.2.3.	Ensayo ELISA.....	39
16.2.4.	Lectura de placas de ELISA.....	39
<b>17.</b>	<b>Plan de trabajo.....</b>	<b>42</b>
<b>18.</b>	<b>Consideraciones éticas y de bioseguridad.....</b>	<b>42</b>
18.1.	Consideraciones éticas.....	42
<b>19.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>43</b>
<b>20.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>54</b>
<b>21.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>22.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>56</b>
<b>23.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>60</b>
23.1.	Invitación a participar y descripción del proyecto.....	60
23.2.	Hoja de recolección de datos.....	68

## **1. Resumen**

### **Introducción**

El cáncer de pulmón es la causa más común de muerte por cáncer en la población mundial, afecta predominantemente a hombres mayores de 65 años con historia de tabaquismo. El cáncer de pulmón se clasifica en dos variantes histológicas: cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). El CPCNP es el más frecuente (80%) y se conforma de tres subtipos: adenocarcinoma (50-60%), carcinoma epidermoide (20-25%) y el de células grandes. El pronóstico en los pacientes depende del estadio clínico al momento del diagnóstico. El tratamiento farmacológico dirigido a moléculas específicas ha mostrado resultados benéficos. Un ejemplo, son los inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como Erlotinib y Gefitinib, aprobados como terapia de primera línea en pacientes con CPCNP (adenocarcinoma pulmonar) y mutación en receptores de tirosin-kinasa.

### **Objetivo**

Cuantificar la expresión de proteína EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) en muestras de lavado broncoalveolar (LBA) en sujetos con cáncer pulmonar y sujetos sin cáncer pulmonar.

### **Material y métodos**

Se realizó un estudio exploratorio que incluyó a sujetos con diagnóstico histopatológico de cáncer pulmonar y controles sin cáncer. Se realizó fibrobroncoscopia a todos los sujetos del estudio, para obtener una muestra de LBA. Estas muestras fueron procesadas por el método de ELISA sándwich (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, *de sus siglas en inglés*) para identificar la cantidad de proteína EGFR en LBA en ambos grupos. Para el análisis estadístico se usó estadística descriptiva, prueba de Ji cuadrada y comparación de medianas por U de Mann-Whitney.

## Resultados

En este estudio se incluyeron 28 sujetos. Del total de la muestra estudiada, 12 fueron sujetos con cáncer de pulmón y 16 controles sin cáncer de pulmón. La media de edad para el grupo de casos fue de  $59.7 \pm$  (DE: 7.38) y para el de controles de  $58.6 \pm$  (DE: 10.39). La media de EGFR en los sujetos con cáncer fue de  $1331.80 \pm$  (DE: 955.62) y para los sujetos sin cáncer pulmonar de  $216.94 \pm$  (DE: 165.45), con una  $p= 0.004$  por *U de Mann-Whitney* y un tamaño del efecto por comparación de medias según *d de Cohen*= 1.62 y tamaño del efecto de 0.63, que corresponde a la diferencia de medias de ELISA cuantitativo entre los casos y los controles.

## Conclusiones

La expresión de proteína EGFR en muestras de lavado broncoalveolar, se encuentra sobre-expresada en sujetos con cáncer pulmonar a comparación de los sujetos sin cáncer pulmonar, con un tamaño del efecto mayor a 0.6 según la *d de Cohen*.

## 2. Introducción

El cáncer pulmonar es la causa más común de muerte por cáncer en el mundo. Se estima una incidencia mayor a 1.8 millones de casos anuales y es causa de más de 1.59 millones de muertes. Es el cáncer más frecuente en hombres en todo el mundo con más de 1.2 millones de casos nuevos por año. En Estados Unidos, el cáncer pulmonar ocupa el tercer lugar de todos los tipos de cáncer y es el primero en mortalidad en población general, con una supervivencia de 5.6% a 5 años. (1) A finales del siglo pasado se registró una disminución considerable de los casos de cáncer en nuestro país, sin embargo, actualmente se mantiene como el segundo tipo de cáncer con mayor letalidad en hombres, únicamente por debajo del cáncer de próstata. (1) (2)

El factor de crecimiento epidérmico (*EGF, por sus siglas en inglés*), fue aislado por primera vez en el año de 1962 por Stanley Cohen. En 1975, se describió la presencia de una molécula a la cual se fijaba el EGF, esta era el receptor de EGF (*EGFR, por sus siglas en inglés*). Fue hasta 1978, cuando se demostró que el EGFR presentaba fosforilación aumentada cuando se acoplaba al EGF. Otro descubrimiento importante acerca de este receptor, fue en 1980, cuando se confirmó que la proteína transformante del virus de sarcoma de Rous, v-src, se fosforilaba en tirosina lo que estableció que el EGFR tenía actividad de tirosina cinasa al unirse al EGF. (3)

### 3. Marco teórico

#### 3.1. Cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón se clasifica de acuerdo a sus características histológicas en dos tipos: cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). El porcentaje de presentación para cada tipo histológico se ha modificado en las últimas décadas, esto a causa de los cambios en el hábito tabáquico, así como a la exposición a otros neumotóxicos. El CPCNP (80%) es el tipo histológico más frecuente, que a su vez se divide en tres subtipos histológicos: adenocarcinoma (50-60%), carcinoma epidermoide (20-25%) y de células grandes. (4)

Estimated incidence, mortality and 5-year prevalence: both sexes

Cancer	Incidence			Mortality			5-year prevalence		
	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	Prop.
Lip, oral cavity	2791	1.9	2.5	767	1.0	0.7	6896	1.9	8.3
Nasopharynx	144	0.1	0.1	67	0.1	0.1	378	0.1	0.4
Other pharynx	508	0.3	0.5	328	0.4	0.3	1137	0.3	1.4
Oesophagus	1143	0.8	1.0	1055	1.3	0.9	1187	0.3	1.4
Stomach	7680	5.2	6.8	6281	8.0	5.5	12791	3.6	15.4
Colorectum	8651	5.8	7.8	4694	6.0	4.1	21694	6.1	26.0
Liver	6387	4.3	5.7	6068	7.7	5.3	4975	1.4	6.0
Gallbladder	1981	1.3	1.8	1861	2.4	1.7	2512	0.7	3.0
Pancreas	4274	2.9	3.8	4133	5.3	3.7	3048	0.9	3.7
Larynx	2479	1.7	2.3	891	1.1	0.8	6990	2.0	8.4
Lung	8439	5.7	7.5	7608	9.7	6.7	8099	2.3	9.7
Melanoma of skin	2031	1.4	1.8	612	0.8	0.5	5755	1.6	6.9
Kaposi sarcoma	88	0.1	0.1	31	0.0	0.0	221	0.1	0.3
Breast	20444	13.8	35.4	5680	7.2	9.7	75629	21.1	176.7
Cervix uteri	13960	9.4	23.3	4769	6.1	8.1	47000	13.1	110.0
Corpus uteri	2733	1.8	4.8	550	0.7	1.0	9847	2.7	23.0
Ovary	3277	2.2	5.6	2105	2.7	3.6	9048	2.5	21.2
Prostate	14016	9.5	27.3	6367	8.1	11.3	41088	11.5	101.3
Testis	1742	1.2	2.8	443	0.6	0.7	5060	1.4	12.5
Kidney	3851	2.6	3.5	2115	2.7	1.9	10047	2.8	12.1
Bladder	3245	2.2	2.9	1166	1.5	1.0	9330	2.6	11.2
Brain, nervous system	4446	3.0	3.9	2237	2.8	2.0	6527	1.8	7.8
Thyroid	3036	2.1	2.6	702	0.9	0.6	11930	3.3	14.3
Hodgkin lymphoma	1543	1.0	1.3	598	0.8	0.5	4250	1.2	5.1
Non-Hodgkin lymphoma	4632	3.1	4.1	2558	3.2	2.3	8700	2.4	10.4
Multiple myeloma	1380	0.9	1.3	1029	1.3	0.9	2418	0.7	2.9
Leukaemia	6325	4.3	5.6	4264	5.4	3.7	6100	1.7	7.3
All cancers excl. non-melanoma skin cancer	147985	100.0	131.5	78719	100.0	68.9	358363	100.0	430.2

Incidence and mortality data for all ages. 5-year prevalence for adult population only.  
ASR (W) and proportions per 100,000.

Tabla 1. Incidencia, mortalidad y prevalencia en México a 5 años de cáncer pulmonar en hombres y mujeres.

Estimated age-standardised incidence and mortality rates: men

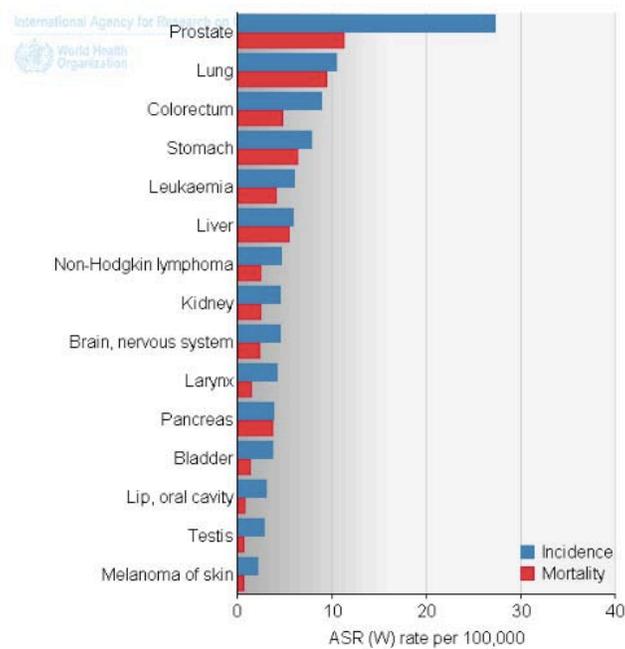


Figura 1. Incidencia y prevalencia de cáncer pulmonar en hombres en México, estimada por edad. Tomado de referencia 1.

Estimated age-standardised incidence and mortality rates: women

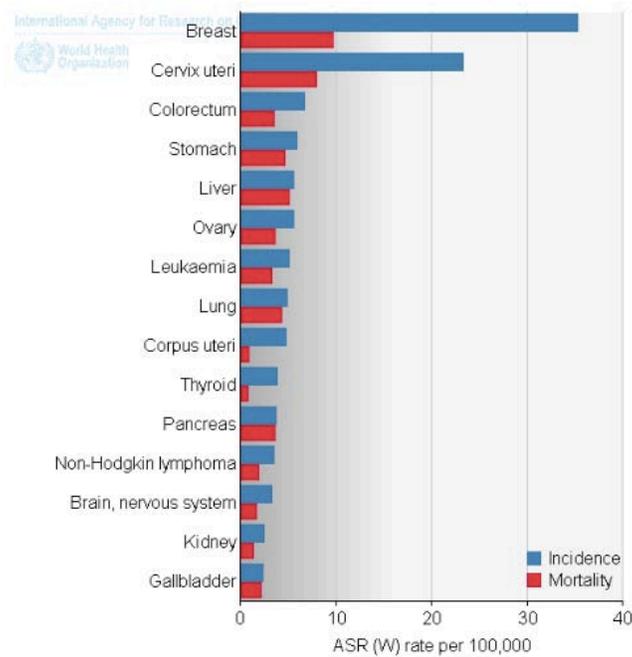


Figura 2. Incidencia y prevalencia de cáncer pulmonar en mujeres en México, estimada por edad. Tomado de referencia 1.

### 3.1.1. Etiopatogenia

El tabaquismo es el principal factor de riesgo de cáncer pulmonar hasta en el 90% de los casos. (5) Otros factores de riesgo son: exposición a radón, asbesto, níquel, contaminación ambiental, entre otros. Un estudio reciente en México demostró la asociación de exposición al humo de leña como factor de riesgo para cáncer pulmonar en mujeres no fumadoras. (6) La incidencia de cáncer de pulmón presenta disminución con el cese del hábito tabáquico, pero, el riesgo se mantiene latente por varios años. (4)

El humo de tabaco produce más de 4000 sustancias químicas bioactivas que interaccionan de forma negativa en el organismo (**tabla 2**). Las complicaciones a la salud causadas por el tabaquismo lo catalogan como la segunda causa de muerte global. El cáncer pulmonar es una de ellas y se proyecta que para el año 2030, será la causa de más de 9 millones de muertes anuales. Uno de los mecanismos carcinogénicos del tabaco es por unión directa al ADN, hecho que incrementa el riesgo de 20 a 40 veces para desarrollar cáncer pulmonar en fumadores. (7) Sin embargo, hasta el 10% de los hombres y el 20% de las mujeres llegan a desarrollar cáncer pulmonar sin antecedente de tabaquismo. (8)

Fase gaseosa	Fase de partículas
Dióxido de carbono	Alquitrán
Monóxido de carbono	Agua
Óxido nitroso	Nicotina
Metano	Fenol
2-butanona	Catecol
Acetonitrilo	Pireno
Amoníaco	Benzo (a) pireno
Dimetilnitrosamina	2,4 dimetilfenol
Nitrobenceno	1 m y p fenol
Acetaldehído	p etilfenol
Isopreno	Sigmasterol
Acetona	Fitoesteroles
Cianidina de hidrógeno	Indol, 2
Tolueno	
Acroleína	
Benceno	
Nitrosopirrolidina	

Tabla 2. Componentes del humo de tabaco. Tomada de referencia (9)

El principal mecanismo carcinogénico descrito asociado al tabaco es la formación de aductos de ADN, que son metabolitos carcinogénicos unidos de forma covalente a las bases adenina y guanosina del ADN. Cuando estos aductos de ADN logran escapar a los diferentes mecanismos de reparación celular y apoptosis, progresan a la formación de mutaciones. Si alguna de estas mutaciones críticas se establece en un oncogen o en un gen supresor, se produce una célula con estructura de reproducción aberrante y desarrolla como consecuencia cáncer pulmonar. (10)

Otras formas de tabaquismo como los puros y las pipas también se asocian a la presencia de cáncer pulmonar, aunque en menor frecuencia que el uso de cigarrillos. Se estima que el uso de 5 puros al día equivale a fumar una cajetilla de cigarrillos en ese mismo periodo de tiempo. Por otra parte, el uso de marihuana y cocaína también se ha asociado a lesiones endobronquiales premalignas en personas con adicción a estas drogas. (11)

Materiales como el polvo de los metales pesados y el asbesto, tiene particular importancia, ya que la exposición crónica genera cambios inmunológicos con potencial carcinogénico. Estos cambios son secundarios a la exposición crónica, que induce a la formación de radicales libres de oxígeno y apoptosis dependiente de la vía mitocondrial en células las epiteliales alveolares y las mesoteliales con mayor frecuencia. (12)

### 3.1.2. Diagnóstico

Es muy importante realizar el diagnóstico oportuno en pacientes con sospecha de cáncer pulmonar, debido a que la mayoría de las veces este se realiza en etapas tardías, el pronóstico resulta ser malo a corto plazo. La posibilidad de detección en etapa clínica temprana, permitiría el tratamiento con cirugía y curación. (13) Para ello se emplean estudios de imagen, biomarcadores y otros procedimientos invasivos como la broncoscopia y la cirugía torácica para estudio histopatológico de las muestras de tejido obtenidas. (14)

El panorama de los pacientes con cáncer pulmonar en etapa clínica avanzada es poco prometedor. (15) Un esfuerzo por encontrar un método diagnóstico de tamizaje en pacientes fumadores y riesgo de cáncer, ha sido el objetivo de múltiples estudios. Algunos compararon a la radiografía de tórax (RXT) y citología de esputo para diagnóstico temprano y no demostraron disminución de mortalidad, a pesar de ser pacientes de más de 45 años y con factores de riesgo asociados a cáncer pulmonar. (16) (17) Algunos otros, carecen de sustento metodológico, que no permite realizar conclusiones a cerca de algún método de tamizaje para disminuir la mortalidad en pacientes con cáncer pulmonar. (18)

Datos clínicos como tos, pérdida de peso, fiebre, disnea y hemoptisis definitivamente nos orientan a sospechar en el diagnóstico. Desafortunadamente, estos signos y síntomas son más evidentes en etapas clínicas avanzadas. La RXT en proyección anteroposterior y lateral, es el primer estudio que se solicita en pacientes con factores de riesgo para cáncer pulmonar. Este estudio, ha demostrado una sensibilidad de menos del 40% para la detección de nódulos pulmonares que la mayor parte del tiempo resultan ser nódulos benignos. (19)

La tomografía axial computada (TAC) es una de las herramientas más utilizadas en el abordaje de la patología respiratoria. Tiene una sensibilidad de hasta 22% para la detección incidental de nódulos pulmonares. (20) En los últimos años se ha propuesto a la TAC de baja dosis como método de tamizaje para cáncer pulmonar con mejores resultados que la RXT, (21) su uso con este objetivo, logró disminuir la mortalidad en un 20% en los pacientes con riesgo alto. (22) Este mismo método se utilizó para normar conducta de tratamiento en pacientes con presencia de nódulos pulmonares en base al tiempo de crecimiento y las características de imagen. Sin embargo, a pesar de la evidencia firme alcanzada por la TC de baja dosis como método de tamizaje, otros estudios con menor número de pacientes discrepan de su utilidad para disminuir mortalidad. (23) (24)

La tomografía contrastada con emisión de positrones (PET-CT, por sus siglas en inglés) de cuerpo completo, a diferencia de la TAC y la RM, no solamente permite la diferenciación de las estructuras anatómicas, sino también es una buena herramienta que establece el sitio exacto de las metástasis, permitiendo con esto estadificar de mejor manera a los pacientes. (25)

La FBO es un procedimiento de mínima invasión, utilizado para diagnóstico o tratamiento, que consiste en introducir un dispositivo de video a la vía aérea. Con los años las indicaciones se han modificado, siendo en la actualidad el estudio de rutina en pacientes con sospecha de cáncer pulmonar por su bajo porcentaje de complicaciones. (26) A pesar de la variedad de procedimientos endoscópicos que se pueden realizar, su rendimiento diagnóstico apenas supera el 60% cuando las lesiones son accesibles por este método de abordaje. (27)

### 3.1.3. Estadificación

Estadio clínico, es un término importante al momento de hablar de cáncer, y el cáncer de pulmón no es la excepción. La última clasificación realizada por la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC, por sus siglas en inglés) y el Comité Americano Mixto contra el Cáncer (AJCC), fue posterior a la revisión estadística de la base de datos mundial de cáncer pulmonar (**figura 2a, 2b y 2c**). Este esfuerzo por comprender mejor el comportamiento de los pacientes con cáncer, es para brindar mayor sobrevida y mejorar el pronóstico de los enfermos. (13)

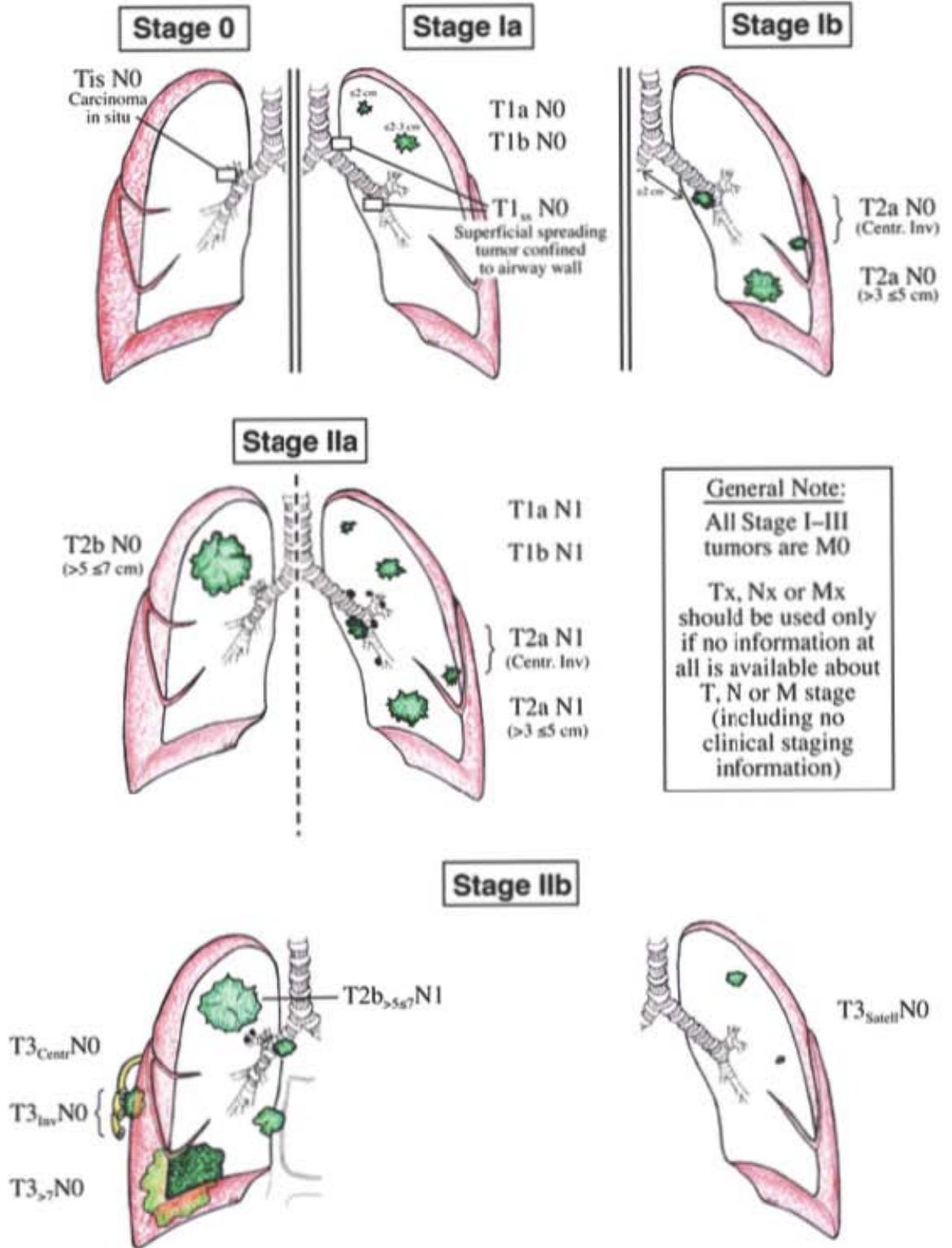


Figura 2a. Representación gráfica de los estadios clínicos 0, I y II del cáncer pulmonar. Tomado de referencia (13).

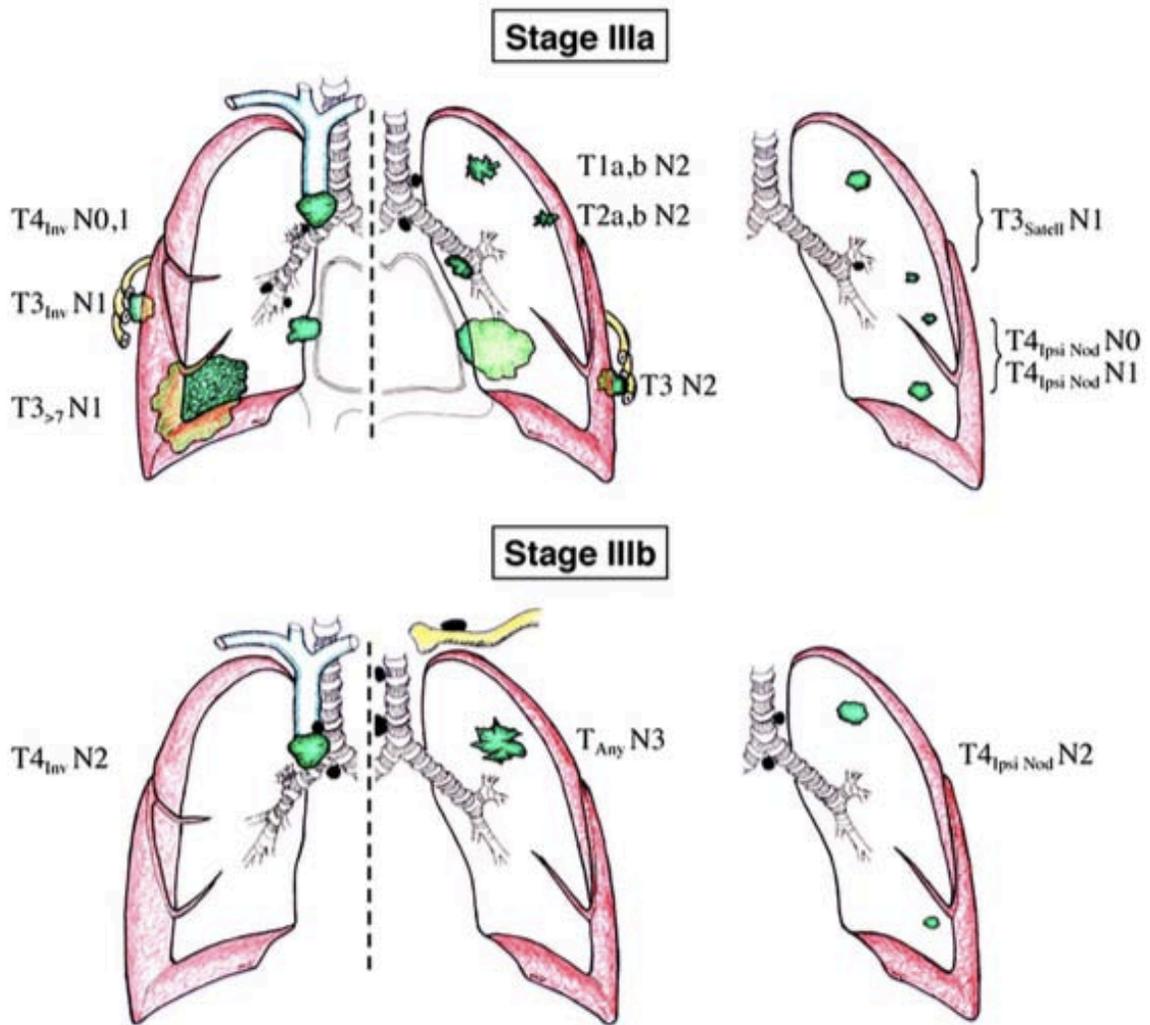


Figura 2b. Representación gráfica del estadio clínico III del cáncer pulmonar. Tomado de referencia (13).

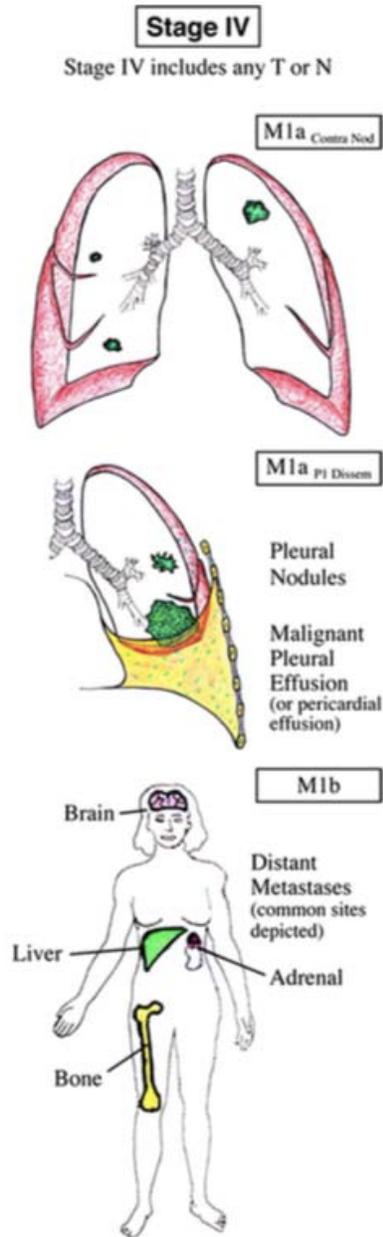


Figura 2c. Representación gráfica del estadio clínico IV del cáncer pulmonar. Tomado de referencia (13).

### 3.1.4. Tratamiento

El cáncer pulmonar es una enfermedad catastrófica que requiere tratamiento inmediato al momento del diagnóstico. La calidad de vida es un factor importante que valorar antes del inicio del tratamiento. (28) La sobrevida de los pacientes con cáncer pulmonar a cinco años y depende del estadio clínico al momento del diagnóstico. Los estadios clínicos I-II (**tabla 3**) son los que más se benefician del tratamiento quirúrgico con fines curativos, con una sobrevida a cinco años de 54-80% y 38-65%, respectivamente. Pero, en estadios III-IV (**tabla 4 y 5**) la sobrevida a 5 años es menor al 10% y muy pocos casos en etapa clínica III pueden ser sometidos a tratamiento quirúrgico con fines de curación. (29) La etapa clínica IV el tratamiento es paliativo con radioterapia y quimioterapia, con mortalidad temprana a pocos meses del diagnóstico. (30) Cabe mencionar que, a pesar del buen pronóstico en pacientes con estadios tempranos, muy pocos son diagnosticados en esta etapa.

---

#### Tratamiento del CPCNP en etapa clínica I/II

---

##### **Tratamiento local**

Lobectomía con toma de muestras de ganglios mediastinales (neumonectomía en caso necesario para alcanzar márgenes quirúrgicos negativos)

##### **Opciones de terapia local en pacientes con alto riesgo**

Resección sublobar (en cuña, segmentectomía)

Radioterapia convencional con haz externo

Terapia con radiación corporal estereotáctica

Ablación con radiofrecuencia

##### **Quimioterapia adyuvante**

Estadio IB (considerar si tumor  $\geq 4$  cm)

Estadio IIA/B (recomendado)

Platino, régimen de 2 fármacos por 4 ciclos

---

Tabla 3. Tratamiento del CPCNP en pacientes con etapa clínica I/II.

Modificado de de referencia (31)

---

**Tratamiento del CPCNP en etapa clínica III**

---

**Terapia estándar**

Quimioterapia actual más radioterapia definitiva

Quimioterapia de inducción seguida de resección quirúrgica

**Opciones en pacientes con riesgo bajo**

Quimioterapia secuenciada seguida de radioterapia

Radioterapia sola

**Estadio III posterior a resección quirúrgica**

Quimioterapia adyuvante: base platino, régimen de 2 drogas por

4 ciclos

Considerar quimioterapia adyuvante posterior a completar la quimioterapia

---

Tabla 4. Tratamiento del CPCNP en etapa clínica III. Modificado de referencia (31)

---

**Tratamiento del CPCNP en etapa clínica avanzada**

---

**Primera línea (quimioterapia combinada)**

Carboplatino/cisplatino + paclitaxel

Carboplatino/cisplatino + docetaxel

Carboplatino/cisplatino + pemetrexed (no escamoso)

Carboplatino/cisplatino + gemcitabina

Bevacizumab (no escamoso)

Erlotinib (tumor con EGFR mutado)

Crizotinib (ALK mutado)

**Segunda línea (monoterapia)**

Docetaxel

Pemetrexed (no escamoso)

Erlotinib

Crizotinib (ALK mutado)

**Tercera línea (monoterapia)**

Erlotinib

**Terapia de mantenimiento (monoterapia)**

Pemetrexed (no escamoso)

Erlotinib

Bevacizumab (no escamoso)

---

Tabla 5. Tratamiento paliativo del CPCNP. Modificado de referencia (31)

Nuevos fármacos, dirigidos a moléculas específicas en pacientes con CPCNP, han resultado efectivos para detener el proceso neoplásico. Destacan los inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como Erlotinib y Gefitinib, aprobados como terapia de primera línea en los pacientes con CPCNP que presentan mutación en los receptores de tirosin-kinasa. Siendo actualmente obligada la búsqueda de estas mutaciones en todos los pacientes con adenocarcinoma antes de iniciar el tratamiento quimioterápico. (32)

### 3.2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

Existe un especial interés en encontrar el método ideal de tamizaje, también es indispensable contar con nuevas herramientas para estadificación, pronóstico y blanco terapéutico. En 1994, Wilkins acuñó por primera vez el término *proteoma* y lo definió como el conjunto de proteínas que pueden ser producidas a través del genoma. (33) La proteómica se proyectó como un cuello de botella para comprender la conformación de muchas especies (34) y principal interés en encontrar la relación entre los genes y la función de acuerdo a cambios producidos por enfermedades y fármacos. (35) Estudios recientes, han demostrado que la expresión de anexina se asocian a resistencia al tratamiento de quimioterapia por agentes de primera línea en cáncer pulmonar. (36)

La caracterización de proteínas en las distintas patologías pulmonares ha aportado una gran cantidad de información acerca de la evolución y el pronóstico de este tipo de enfermedades. Esto nos ha llevado a conocer los perfiles de expresión de proteínas en patologías como la fibrosis pulmonar, sarcoidosis, proteinosis alveolar, etc. (37)

En cáncer pulmonar se han reportado alteraciones en los perfiles de expresión de micro RNA (miRNAs) en el tejido tumoral comparado con tejido sano adyacente; así como evidencias de que dichos miRNAs tisulares alterados podrían utilizarse en el

diagnóstico, clasificación histológica y estimación de la prognosis de este tipo de cáncer (**figura 3**). (38)

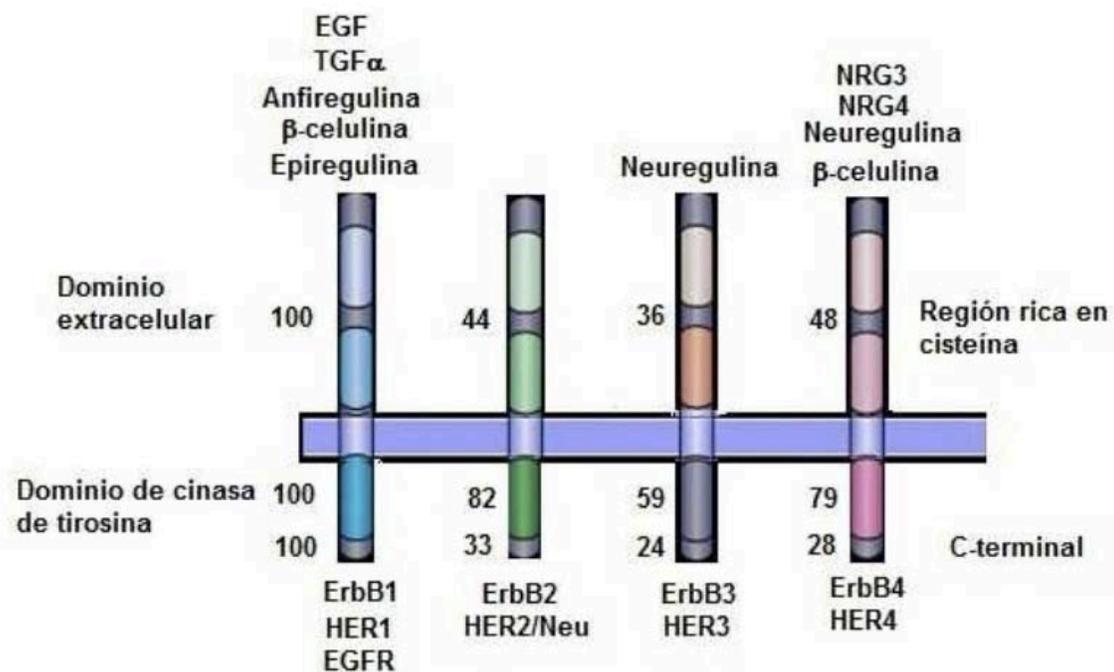
miRNA	Expresión asociada	Núm. de muestras analizadas y su clasificación histológica	Núm. de miRNAs analizados	Ensayo	Conservación de la muestra
hsa-miR-26 <sup>a</sup>		205 AD	440	Microarreglos	Tejido en parafina
hsa-let-7g	AD	SCC			
hsa-let-7f		Fumadores masculinos			
hsa-miR-98					
hsa-miR-205		60 AD 62 SCC	600	Microarreglos	
	SCC	21 SCC 15 AD	1	qRT-PCR	Tejido en parafina
		24 SCC 49 AD	1	qRT-pcr Ensayo ciego	
hsa-miR-205	SCC	52 SCC 50 AD	1	qRT-PCR	Tejido en parafina

**Figura 3.** Expresión a nivel del tejido de biopsia de miRNA en cada tipo de cáncer pulmonar. Tomado de referencia. (38)

El EGFR es una proteína transmembrana de 170 kDa de la familia de los receptores de factor de crecimiento epidérmico humano (HER, *por sus siglas en inglés*). (39) Los receptores de la familia ErbB/Her, pertenecen a la subclase I de la súper familia receptores tirosina cinasa (RTKs). La actividad de estos receptores se centra en la mediación y regulación de las señales del medio externo hacia el interior de las células, su relevancia es evidente ya que participa en procesos que van desde el desarrollo embrionario hasta el órgano adulto en función, ó en procesos de proliferación celular, diferenciación, migración y reorganización estructural. (40)

La familia de receptores tirosina cinasa ErbB/HER (RTK), comprende a cuatro miembros: ErbB-1/Her1, ErbB-2/Her2 (neu), ErbB-3/Her3 y ErbB4/Her4 (**figura 4**).

Todos los miembros de la familia comparten un dominio extracelular de unión a ligando (ectodominio), un dominio hidrófobo transmembranal y un dominio citoplasmático, conteniendo un subdominio con actividad intrínseca de tirosina cinasa. Aun cuando los cuatro miembros de la familia comparten en general la misma estructura, cada uno de ellos posee en su estructura algunas particularidades muy específicas que son de suma importancia en la complementariedad de los dímeros así como la selectividad en la activación específica de las vías de señalización. (41)

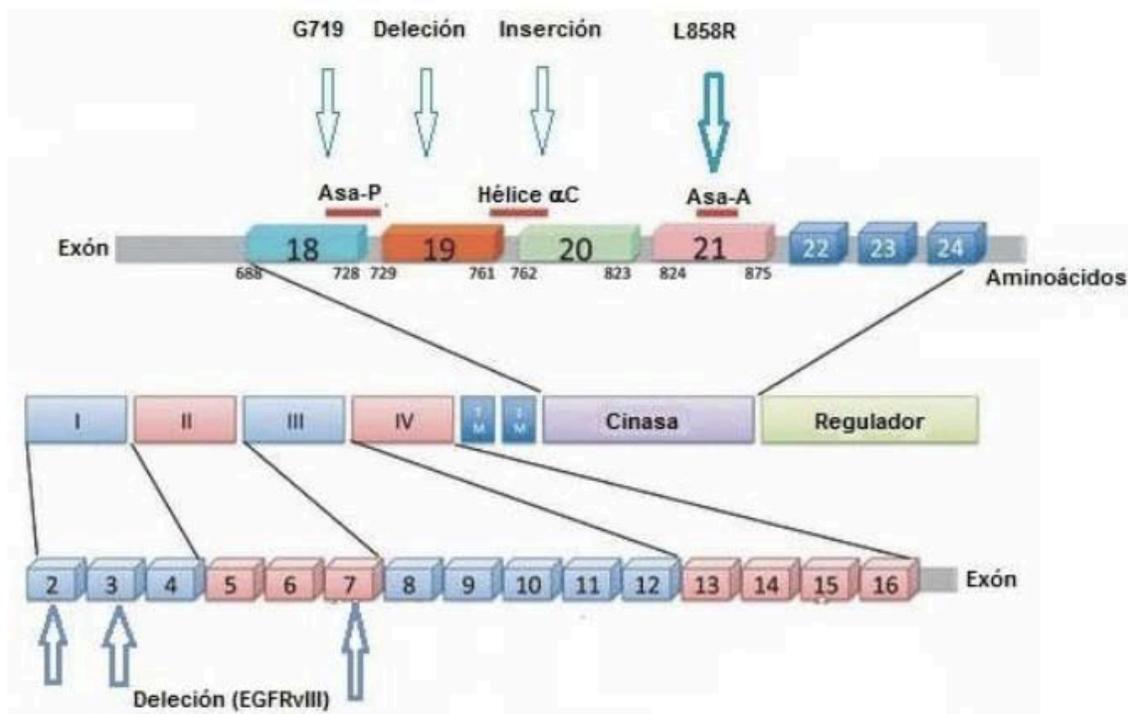


**Figura 4.** Familia de receptores ErbB/HER. Los miembros de la familia ErbB comparten un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que comprende la actividad catalítica de cinasa de tirosina. (tomado de ref. (40))

La complejidad de la vía de señalización de EGFR y su importancia en crecimiento celular y la sobrevivencia resaltan el papel de las alteraciones de EGFR en el

desarrollo y mantenimiento de condiciones patológicas como el cáncer. Las anomalías en las funciones de EGFR están asociadas con todas las características del desarrollo y crecimiento del cáncer incluyendo la proliferación celular autónoma, la invasión, la angiogénesis y el potencial metastásico. Aberraciones en la señalización de EGFR pueden iniciarse por varios eventos como una producción alterada de ligandos, mutaciones y deleciones en los receptores, o por activación persistente. Niveles altos en la expresión de EGFR son características comunes de un fenotipo maligno en algunos tumores sólidos. (42)

La determinación de sobre expresión y mutaciones de EGFR en el CPCNP, es el objetivo principal antes del tratamiento con quimioterapia, ya que una proporción de más de 32.8% de los pacientes resulta positivo a la detección de mutaciones de EGFR. Un resultado positivo de mutaciones de EGFR (**figura 5**), además de ser factor pronóstico permite dirigir la terapia específica con fármacos inhibidores de los RTKs como erlotinib, gefitinib y nintedanib. (43)



**Figura 5.** Mutaciones presentes en EGFR. (tomado de ref. (40))

Se han descrito varias técnicas para la cuantificación de proteína EGFR y la determinación de mutaciones en el gen. (43) Recientemente un estudio publicado por Almatroodi et al (44), que caracterizó por medio de geles de dos dimensiones el patrón de proteínas en muestras de lavado broncoalveolar de sujetos con y sin adenocarcinoma pulmonar, demostró la presencia de una expresión diferencial de proteínas en sujetos con adenocarcinoma comparado con sujetos sanos.

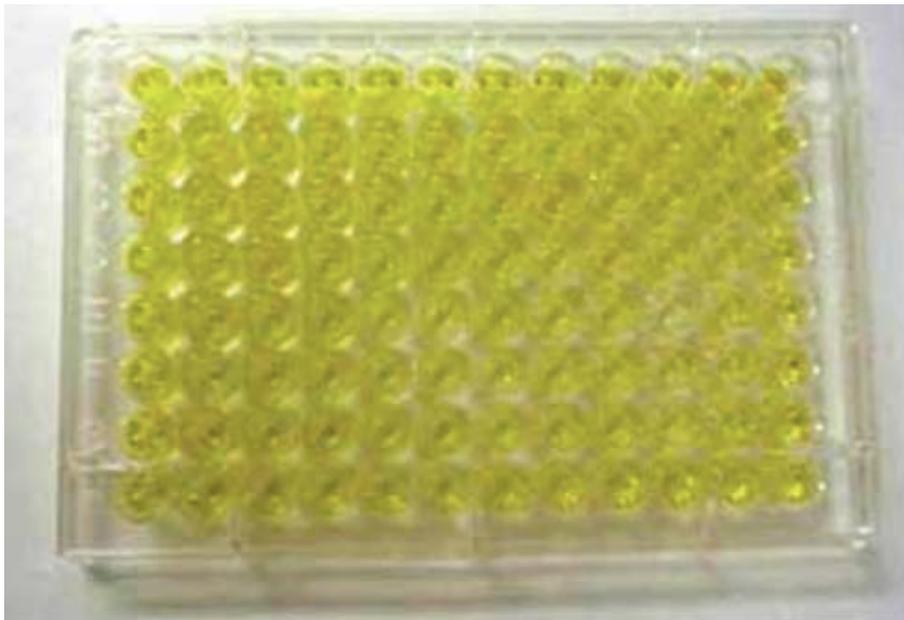
Varios estudios han demostrado que la expresión de EGFR correlaciona con menor supervivencia libre de enfermedad y, mal pronóstico además de mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad, en un estadio tumoral avanzado existe un mayor riesgo de metástasis. (45) La amplificación del gen que conduce a la sobreexpresión de EGFR es una característica frecuente en muchos cánceres humanos, a menudo acompañados de otras reorganizaciones estructurales que causan deleciones en el dominio extracelular del receptor, la más frecuente es la variante de tipo III del EGFR humano (EGFRvIII). (46)

### 3.3. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

El ELISA es un ensayo inmunoabsorbente que al igual que otros, utiliza anticuerpos como reactivos enlazantes específicos a las moléculas que se desean estudiar. Una de sus mayores aplicaciones biológicas es la cuantificación de fármacos, sustancias biológicas, infecciosas o anticuerpos en fluidos corporales. Los ensayos inmunoenzimáticos fueron descritos en 1971 por Engvall y Perlmann, y Van Wemen y Schuurs, sin embargo, el uso de material radioactivo ha limitado el uso del radioinmunoensayo, y a la vez ha popularizado el empleo del inmunoensayo enzimático (EIA), del que hay dos técnicas principales: el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y el ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT). (47)

En todos los tipos de ELISA, una enzima se une covalentemente a un antígeno o a un anticuerpo. El ELISA permite la detección de anticuerpos cuando la enzima está unida a un anticuerpo antiinmunoglobulina humana, y de antígenos cuando la enzima está unida a un anticuerpo contra un antígeno específico. Todos los ELISA están compuestos de lo siguiente (**figura 6**): (48)

1. Un antígeno o un anticuerpo específico marcado con una enzima (conjugado). Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa.
2. Un soporte para dicho antígeno o anticuerpo. Generalmente se utiliza una placa de poliestireno con 96 pocillos.
3. Un sustrato que será transformado por la enzima en un producto detectable. Los productos pueden detectarse por métodos colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes.
4. Un sistema para detectar dicho producto
5. Existen diversos tipos de ELISA, pero los más importantes son el directo, el indirecto y el de captura o sándwich.



**Figura 6.** Producto coloreado posterior a la reacción enzimática en una placa de 96 pocillos. Figura tomada de referencia (48).

A continuación, se detallan los diferentes tipos de ELISA:

### 3.3.1. *ELISA directo*

Detecta anticuerpos específicos en una muestra. Consiste en administrar la muestra del paciente directamente al pocillo, para que el anticuerpo de interés se adhiera a dicho pocillo. Posteriormente se realiza un lavado para eliminar lo que no se haya unido al soporte (pocillo). Luego se agrega un anticuerpo específico conjugado con la enzima, el cual se unirá al antígeno si este se absorbió en el paso anterior. Por último, viene una nueva fase de lavado para eliminar todo el conjugado no unido y la lectura tras agregar un agente colorimétrico (**figura 7a**). (48)

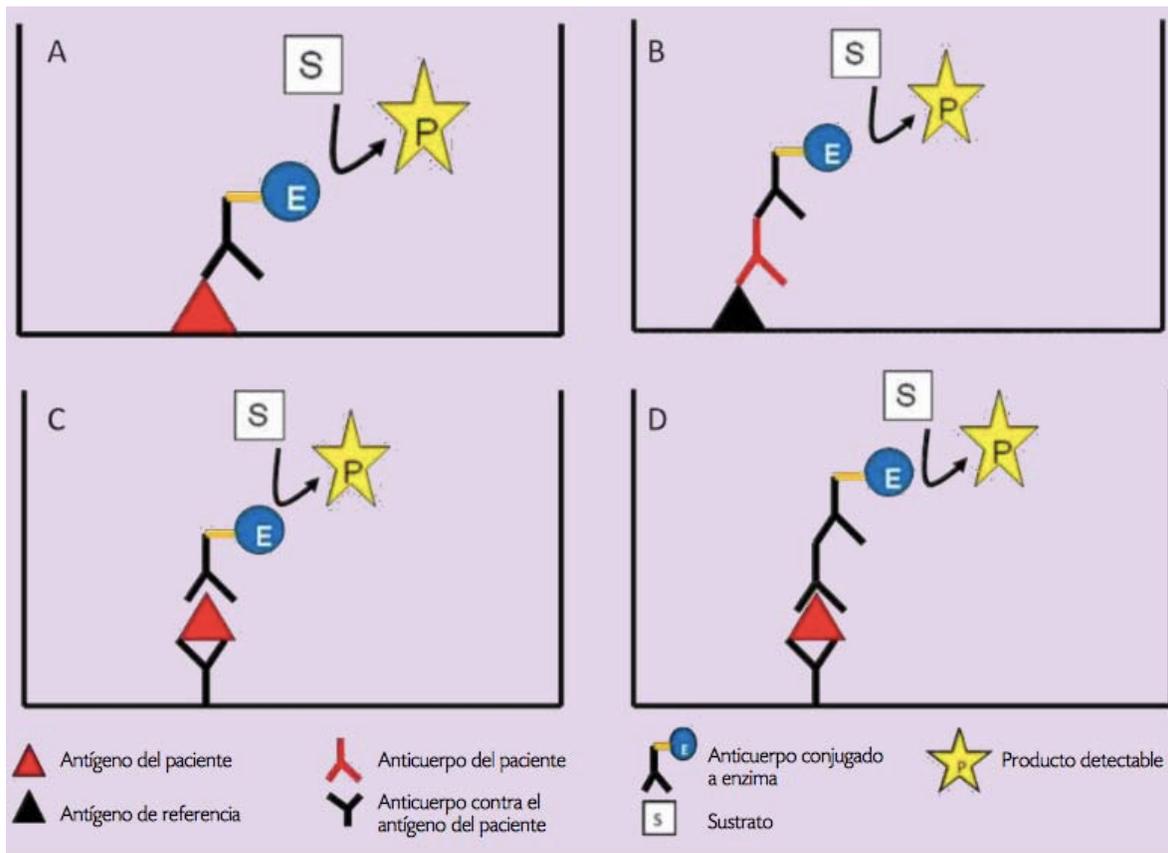
### 3.3.2. *ELISA indirecto*

En esta prueba, el kit viene con el soporte unido a un antígeno específico contra el que se unirá el anticuerpo que se desea encontrar. Como primer paso, se agrega la muestra del paciente sobre el soporte. Posteriormente, se realiza un lavado con la finalidad de eliminar todo lo que se haya unido al antígeno, luego, se agrega un anticuerpo el cual se unirá al anticuerpo de interés solo si está presente en la muestra. Después viene una segunda fase de lavado en la que se elimina todo el conjugado que no se unió para posteriormente agregar un agente colorimétrico detectable y realizar la lectura. (**figura 7b**) (48)

### 3.3.3. *ELISA sándwich*

Se basa en una reacción de enlace competitivo entre el hapteno de la muestra y el hapteno conjugado con la enzima en un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo. El enlace del anticuerpo al hapteno conjugado con la enzima produce inhibición de la actividad enzimática. Esta inhibición se debe a que el anticuerpo

interfiere estéricamente con el enlace del sustrato al sitio catalítico de la enzima o el enlace del anticuerpo transforma la configuración de la enzima. La cantidad de hapteno en la muestra determina el número de sitios para anticuerpos disponibles para enlazar e inactivar el hapteno conjugado con la enzima. A medida que hay más hapteno hay menos anticuerpo disponible para inhibir la actividad enzimática, por lo que el cambio de color se observa directamente proporcional a la cantidad de hapteno presente en la muestra. (**figura 7c y 7d**) (47)



**Figura 7.** a) ELISA directo, b) ELISA indirecto, c) ELISA sándwich directo, d) ELISA sándwich indirecto. Figura tomada de referencia (48).

#### **4. Planteamiento del Problema**

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en la población mundial. La incidencia es de aproximadamente 1,8 millones de nuevos casos por año y la mortalidad es de más de 1.5 millones de muertes por año. Los principales factores de riesgo son el tabaquismo y la exposición a otros neumotóxicos como el humo de combustibles orgánicos. El diagnóstico temprano en pacientes con factores de riesgo, pero, sin síntomas, es un reto para los clínicos. El pronóstico en enfermedad avanzada, resulta ser desalentador al momento del tratamiento. Múltiples consensos alrededor del mundo, unen esfuerzos para mejorar la proporción de pacientes diagnosticados en etapas tempranas, con la finalidad de mejorar la sobrevida con tratamiento oportuno. Año con año, se describen nuevas técnicas de tamizaje y diagnóstico en estos pacientes.

## **5. Justificación**

La mortalidad se debe principalmente a un diagnóstico tardío. La identificación y tratamiento temprano tendrá como consecuencia una disminución de la mortalidad. Sin embargo, las herramientas actuales destinadas a cumplir este propósito no son lo suficientemente efectivas. Por lo tanto, es indispensable encontrar nuevas estrategias que apoyen el diagnóstico. La fibrobroncoscopia es un estudio de mínima invasión que se realiza como parte del estudio para diagnóstico y estadificación de los pacientes con cáncer pulmonar. No obstante, la sensibilidad y especificidad de este procedimiento depende de muchos factores.

Las muestras de lavado broncoalveolar permitirán el análisis cuantitativo de la expresión de proteínas en pacientes con cáncer pulmonar, siendo una herramienta más para el diagnóstico, pronóstico y probablemente como apoyo en la terapia a moléculas blanco en pacientes en etapa avanzada de la enfermedad. Además, existen estudios que han encontrado una expresión característica de proteínas en pacientes resistentes a manejo con fármacos quimioterápicos de primera línea. Por otra parte, en México no se han realizado estudios de búsqueda de proteína EGFR obtenidas de muestras de lavado broncoalveolar en pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar.

## **6. Pregunta de investigación**

¿Cuál es la expresión de la proteína EGFR en muestras obtenidas de lavado broncoalveolar de sujetos con cáncer pulmonar?

## 7. Hipótesis

**Si** los procesos de migración, proliferación, vascularización, y apoptosis celular se encuentran incrementados en los pacientes con cáncer, **entonces** la proteína EGFR que participa en estos procesos se encontrará sobre-expresada en muestras de lavado broncoalveolar obtenidas por fibrobroncoscopía en sujetos con cáncer pulmonar obteniendo en una diferencia de medias un tamaño del efecto mayor 0.6 comparado con controles sin cáncer pulmonar.

## **8. Objetivos**

### 8.1. General

1. Cuantificar la expresión de proteína EGFR en muestras de lavado broncoalveolar de sujetos con cáncer pulmonar y sujetos sin cáncer pulmonar.

### 8.2. Secundarios

1. Describir las principales variables sociodemográficas de los sujetos con cáncer pulmonar y los sujetos sin cáncer

## **9. Metodología**

### 9.1. Diseño del estudio

Por diseño de estudio: observacional descriptivo

Por tiempo: transversal

Por visión: prospectivo

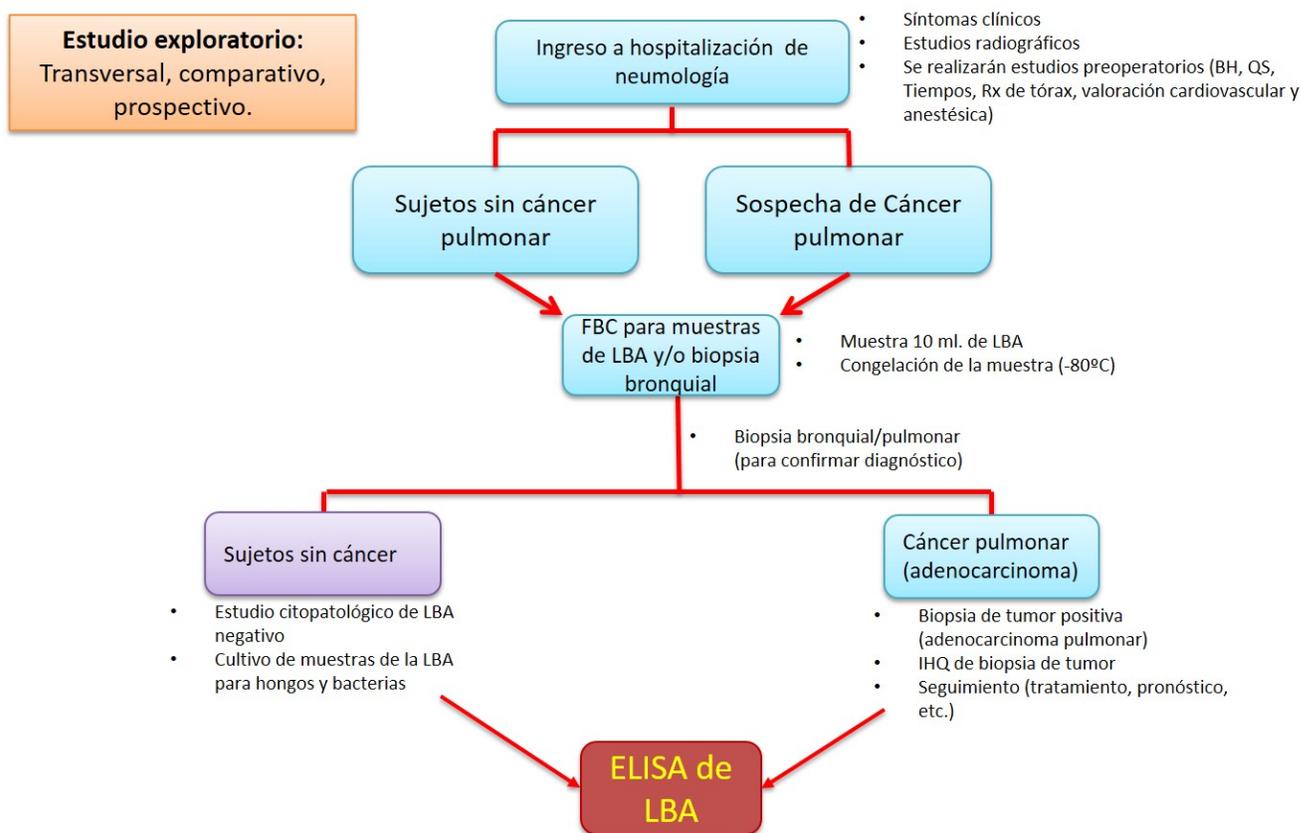
Por toma de la muestra: prolectivo

Por tamaño de la muestra: estudio exploratorio

Por uso de control y de procedimiento: comparativo

## 10. Método de estudio

Se determinará de manera cuantitativa por medio de ELISA sándwich la expresión de proteínas en el componente acelular de muestra de lavado broncoalveolar en pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer pulmonar. Todos los pacientes serán sometidos a fibrobroncoscopia para obtención de muestras de lavado broncoalveolar (**figura 8**).



**Figura 8.** Diagrama de flujo para la selección de pacientes.

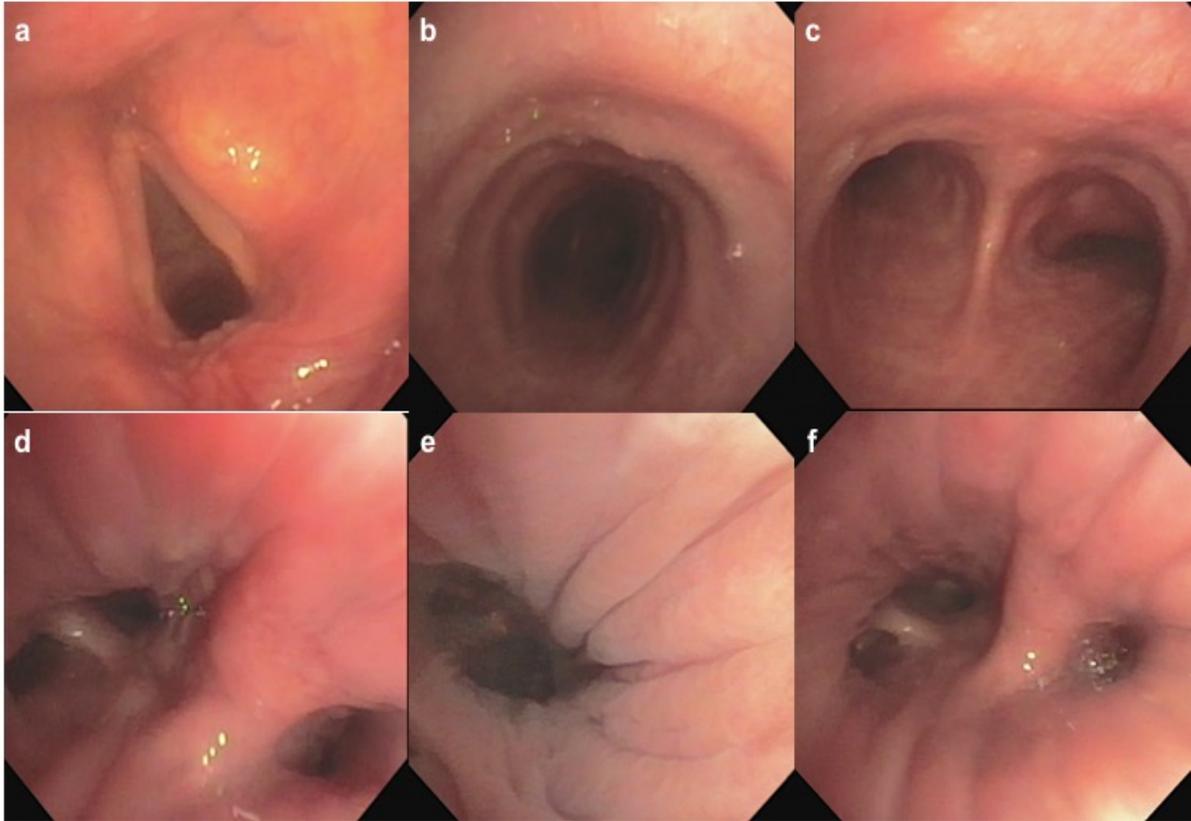
## 11. Obtención de la muestra

### 11.1. Recolección de la muestra

Se realizó Fibrobroncoscopia (FBO) por personal entrenado, a todos los sujetos que cumplieron con los criterios de selección para el estudio. Se emplearon los broncoscopios marca OLYMPUS Q-180, OLYMPUS T-180 EXERA II y OLYMPUS T30. Previo a la FBO, se realizaron estudios preoperatorios que incluyeron biometría hemática (BH), química sanguínea (QS), tiempos de coagulación, RXT y valoración por los servicios de anestesia y cardiología, a todos los pacientes.

Para la obtención de la muestra se instilaron no más de 120 ml de solución salina al 0.9% previamente calentada a 37°C en alícuotas de 20 ml. Se aplicó succión intermitente por el canal de aspiración del broncoscopio a una presión entre 50-80 mmHg y se recolectó la muestra en trampa estéril procurando que esta sea del 40-70% del volumen total instilado para considerarse como una muestra adecuada. Todas las muestras se almacenarán en refrigerador de ultra baja temperatura a -80°C para su preservación (**figura 9**).

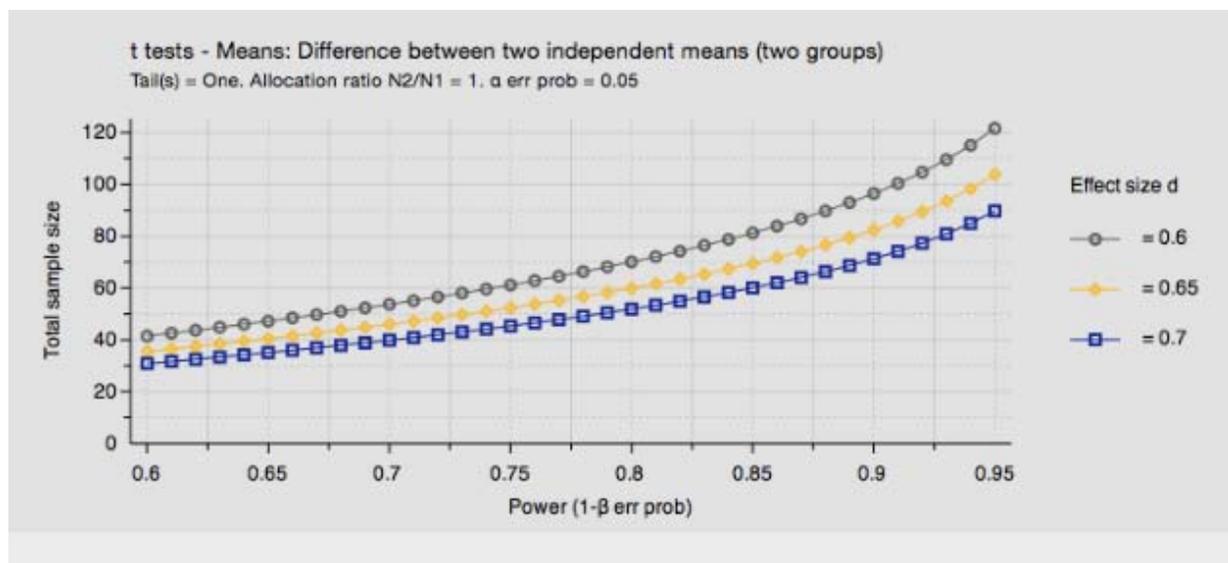
Posterior al procedimiento, todos los sujetos fueron valorados por un periodo de 2 horas en la unidad de cirugía ambulatoria con monitoreo continuo de la tensión arterial, saturación de oxígeno, temperatura y frecuencia cardíaca. Todos fueron egresados a una sala general y en caso de haber presentado alguna complicación mayor, fueron ingresados a la Unidad de Cuidados Intensivos Respiratorios para continuar con la vigilancia.



**Figura 9.** Imágenes de videobroncoscopia de un sujeto incluido en este estudio, **a)** cuerdas vocales, **b)** visión hacia abajo de la traquea desde su tercio superior, **c)** carina principal y bronquio principal derecho e izquierdo, respectivamente, **d)** enclavamiento del broncoscopio a bronquios basales derechos, **e)** instilación de solución salina 0.9% en bronquios basales derechos, **f)** bronquios basales derechos al momento de la aspiración y toma de muestra de lavado broncoalveolar.

## 11.2. Cálculo de la muestra.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó el programa *Gpower* (**Figura 10**), para diferencia de medias independientes a un poder de 80% y alfa de 0.05, correspondía a una relación de 1:1, un total de 36 casos y 36 controles.



**Figura 10.** Cálculo de tamaño de muestra en programa *Gpower*, para medias independientes.

## **12. Universo de estudio**

### 12.1. Proceso de reclutamiento

Se incluyeron todos los pacientes que fueron hospitalizados, en el Servicio de Neumología Unidad 406 “Dr. Alejandro Celis” del Hospital General de México (HGM), por sospecha clínica de cáncer pulmonar y que cumplieron los criterios de selección. Después de explicar los objetivos del estudio y los procedimientos básicos que se requirió realizar, se explicó la carta de consentimiento informado, aquellos que aceptaron y firmaron esta carta fueron incluidos en el estudio. Las muestras de lavado broncoalveolar fueron obtenidas de acuerdo al protocolo antes descrito.

En cuanto a los grupos control, se invitó a participar a sujetos sin cáncer pulmonar que acudan al servicio de Endoscopia torácica del HGM para estudio de FBO y que cumplieron con los criterios de inclusión para los controles y que firmaron la carta de consentimiento informado.

Posterior a la firma del consentimiento informado, se procedió al llenado de las hojas de captura. La información obtenida de los pacientes se descargó en una base de datos en una hoja de Excel v. 2016.

## 13. Criterios de Selección

### 13.1. Criterios de inclusión

#### 13.1.1. Pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar

- Género: Masculino/femenino
- Edad: mayor de 18 años
- Diagnóstico de cáncer pulmonar por inmunohistoquímica
  - Datos clínicos (tos, pérdida de peso, hemoptoicos, etc.)
  - Estudios de imagen (tumor, nódulo pulmonar, derrame pleural, etc.)
- Sin tratamiento previo (El tratamiento puede interferir con la expresión de proteínas)
- Cualquier estadio clínico

#### 13.1.2. Pacientes sin diagnóstico de cáncer pulmonar

- Género: Masculino/femenino
- Edad: mayor de 18 años
- Sin diagnóstico de cáncer pulmonar
  - No datos clínicos de neoplasia pulmonar (tos, pérdida de peso, hemoptoicos, etc.)
  - Estudios de imagen negativos
  - Citología de esputo o lavado broncoalveolar negativo a células neoplásicas
- Indicación precisa de fibrobroncoscopia diagnóstica

13.2. Criterios de exclusión

- Que no acepte el estudio de fibrobroncoscopia
- Mujeres embarazadas
- Ingesta crónica de esteroides orales

13.3. Criterios de eliminación

- Que no se confirme el diagnóstico de adenocarcinoma por biopsia
- Mala calidad de la muestra al momento de su análisis

#### **14. Ubicación del estudio**

Los pacientes fueron reclutados en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Las muestras fueron procesadas en el la Unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM.

#### **15. Variables del estudio y caracterización (tabla 6)**

##### 15.1. Variables independientes

1. Diagnóstico de cáncer pulmonar

##### 15.2. Variables dependiente

1. Expresión de proteína EGFR en muestras de lavado broncoalveolar.

##### 15.3. Probables variables modificadores del efecto

1. Enfermedades sistémicas (diabetes, hipertensión, EPOC)
2. Ingesta crónica de fármacos

**Tabla 6.** Caracterización de las variables.

Nombre	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medida	Análisis estadístico
Edad	Continua	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Número de años cumplidos	Años	U de Mann-Whitney
Índice de biomasa	Continua (modificadora)	Número de horas por el número de años de exposición	Número de horas de exposición al humo de leña al año	Horas/año	U de Mann-Whitney
Índice tabáquico	Continua (modificadora)	Número de cigarrillos por el número de años entre 20 (constante)	Número de paquetes de cigarrillos fumados al año	Paquetes/año	U de Mann-Whitney
Cáncer pulmonar	Independiente (dicotómica)	Diagnóstico histopatológico y/o inmunohistoquímica de adenocarcinoma pulmonar	Tener cáncer pulmonar	si/no	Ji Cuadrada
EGFR	Dependiente (continua)	Patrón de expresión de proteínas determinadas por ELISA cuantitativo	Expresión de proteínas en LBA	ng/ml	U de Mann-Whitney
Comorbilidades <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• Hipertension arterial</li> <li>• EPOC</li> </ul>	Cualitativa (modificadora)	La presencia de uno o más trastornos además de la enfermedad o trastorno primario	Estar bajo un régimen de tratamiento para DM 2, HAS, EPOC, etc.	Si/no	Ji cuadrada

## 16. Descripción de procedimientos

### 16.1. Exámenes de laboratorio y gabinete.

Se realizó ELISA sándwich de cada muestra de lavado broncoalveolar en pacientes con cáncer de pulmón confirmado por inmunohistoquímica y sujetos sin cáncer pulmonar.

Los estudios realizados para el diagnóstico de cáncer de pulmón, fueron llevados a cabo en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” como parte de la evaluación habitual de los pacientes.

### 16.2. ELISA sándwich

#### 16.2.1. Extracción de proteínas

Previamente se centrifuga la muestra para eliminar el pellet (parte celular) y sólo permanecer con el sobrenadante.

Se toma un mililitro de muestra (sobrenadante) y se coloca en hielo. Posteriormente se coloca un mililitro de solución precipitante 1 (TCA/DTT/Acetona) y se deja incubar por un período de 30 minutos, posteriormente se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min y se elimina el sobrenadante. Se vuelve a colocar agente precipitante 2 (DTT/ acetona) y se deja incubando 5 minutos en hielo, para posteriormente centrifugar y eliminar sobrenadante. Finalmente se coloca en buffer de fosfatos al mismo volumen y se guarda la muestra hasta su análisis (ensayo ELISA).

TCA= ácido tricloroacético

DTT= Ditiotritol

### 16.2.2. Preparación de la placa.

1. Dilución del anticuerpo de captura con la concentración recomendada en la hoja de trabajo del Kit Human Total EGF R/ErbB1 DuoSet IC. Inmediatamente, colocar 100  $\mu$ L del Anticuerpo de Captura en cada pozo. Sellar la placa e incubar por toda una noche a temperatura ambiente.
2. Aspirar cada pozo y lavar con el Buffer de lavado, repitiendo este proceso 2 veces hasta un total de 3 lavados. Lavar llenando cada pozo el Buffer de lavado (400  $\mu$ L) usando el chorro de la botella, colector dispensador o autolavador. Remover el líquido completamente en cada paso es esencial para un resultado adecuado. Después del último lavado, remover cualquier resto del Buffer de lavado aspirando o invirtiendo la placa y golpeándola sobre una toalla limpia de papel.
3. Bloquear las placas agregando 300  $\mu$ L de Buffer de bloqueo en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por 1-2 horas.
4. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2. Las placas están listas para la adición de la muestra.

### 16.2.3. Ensayo de ELISA.

1. Agregar 100  $\mu$ L de muestra o normalizador en el área indicada para este fin como se recomienda en la hoja del Kit Human Total EGF R/ErbB1 DuoSet IC, o un diluyente apropiado por pozo. Cubrir la placa con nylon adhesivo e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
2. Repetir el proceso de aspirado/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa.
3. Agregar 100  $\mu$ L del Anticuerpo de detección, diluir con el diluyente, en cada pozo. Cubrir nuevamente con un nylon e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
4. Repetir el proceso de aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa.

5. Inmediatamente antes de usar, diluir la Estreptavidina-HRP a las concentraciones de trabajo especificadas en la etiqueta del vial usando el Diluyente # 1. Agregar 100  $\mu$ L del diluyente Estreptavidina-HRP en cada pozo. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar exponer la placa a la luz.
6. Repetir el proceso de aspirado/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa.
7. Agregar 100  $\mu$ L de la solución sustrato a cada pozo. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar exponer la placa a la luz.
8. Agregar 50  $\mu$ L de solución de paro en cada pozo. Tapar la placa gentilmente para asegurar la incorporación de la mezcla.
9. Determinar la densidad óptica de cada pozo inmediatamente, usando el equipo lector de microplacas de 450 nm. Si la curva de corrección está disponible, evaluar a 540 o 570 nm. Si la curva de corrección no está disponible, obtener la lectura a 540 nm o 570 nm de las lecturas tomadas a 450 nm. Esta sustracción debe ser corregida de las imperfecciones ópticas de la placa. Las lecturas hechas directamente a 450 nm sin corrección pudieran ser elevadas y menos exactas.

#### 16.2.4. Lectura de placas de ELISA

Posteriormente se midió absorbancia a 540 nm en lector de placas de ELISA (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader). Posteriormente se analizaron los resultados obtenidos mediante el software libre de *elisaanalysis.com* (**figura 11 y 12**)

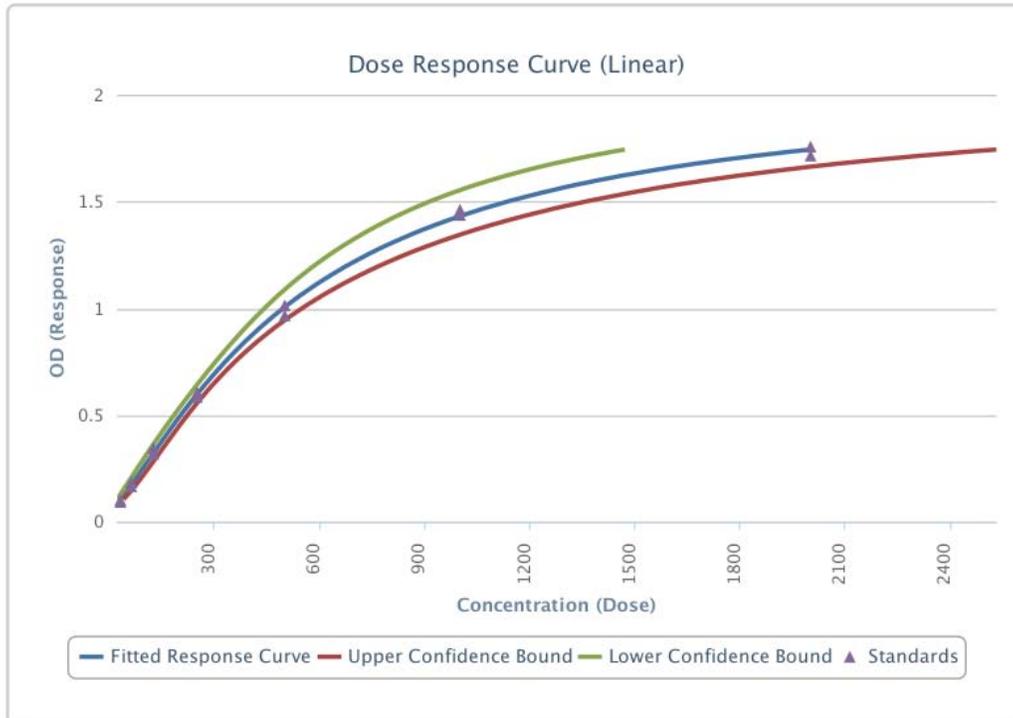


Figura 11. Curva de patrón lineal de EGFR en lavado bronquial.

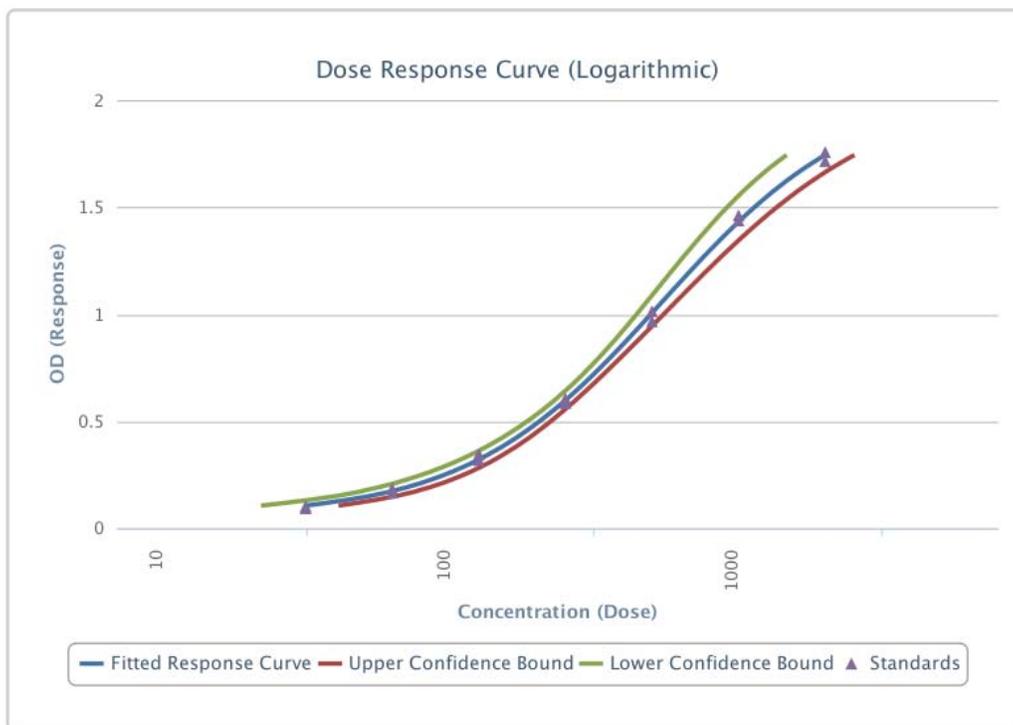


Figura 12. Curva de patrón logarítmico de EGFR en lavado bronquial.

## 17. Plan de trabajo

<b>Meses</b>	<b>Actividad</b>
Julio 2015 – Julio 2016	Recolección de muestras
Marzo - agosto 2016	Procesamiento de las muestras
Septiembre 2016 – enero 2016	Análisis de resultados y elaboración del artículo para publicación
Marzo 2016	Presentación de resultados

## 18. Consideraciones éticas y de bioseguridad

### 18.1. Consideraciones éticas

Se elaborará un escrito, el cual deberá ser aprobado por las Comisiones de Ética de la Institución participante. En este escrito se incluirá: Justificación y objetivos del estudio, riesgos, beneficios, alternativas, libertad de decisión, confidencialidad, entrega de información, y compensación. El consentimiento informado será firmado por el participante y dos testigos

Los sujetos que cumplan los criterios de inclusión de los dos grupos serán invitados a participar en el estudio. Se les entregara el consentimiento informado, se resolverán todas las dudas acerca del estudio, y solo serán incluidos después de que voluntariamente firmen la carta de consentimiento informado.

## 19. Resultados

Se incluyeron a 29 sujetos en el estudio, 13 fueron casos con cáncer pulmonar y 16 controles sin diagnóstico de cáncer pulmonar. La media de edad para los casos fue de  $59.7 \pm$  (DE: 7.38) y para los controles de  $58.6 \pm$  (DE: 10.39), sin observarse diferencia estadística entre grupos con un valor de  $p=0.75$  (IC: -6.13-8.38). Otras variables estudiadas como peso, comorbilidades asociadas, antecedente de cáncer en la familia, exposición a biomasa, tabaquismo y exposición a asbesto no reportaron diferencia estadística significativa entre ambos grupos, con valores de  $p$  mayores a 0.05. (**tabla 7**).

**Tabla 7.** Principales datos sociodemográficos de la muestra de pacientes estudiada.

Variable	Ca. Pulmón (n=13)	Controles (n=16)	Valor de <i>p</i>
<b>Edad</b> , media (DE)*	59.8 (7.08)	58.6 (10.39)	0.72
<b>Peso</b> *	66.3	65.2	0.74
<b>Co-morbilidades**</b>			
-DM_2	2	8	0.11
-HAS	2	2	0.29
-EPOC	1	0	0.25
<b>Ca_familiar**</b>			
-Pulmón	1	-	0.33
-Esófago	1	-	
-Estomago	1	-	
-Melanoma	1	-	
-Mama	-	1	
-Próstata	-	1	
<b>Tabaquismo</b> (> 10 años)**	3	-	1.0
<b>Exp. Biomasa**</b>	1	-	0.57
<b>Exp_Asbesto**</b>	-	1	1.0

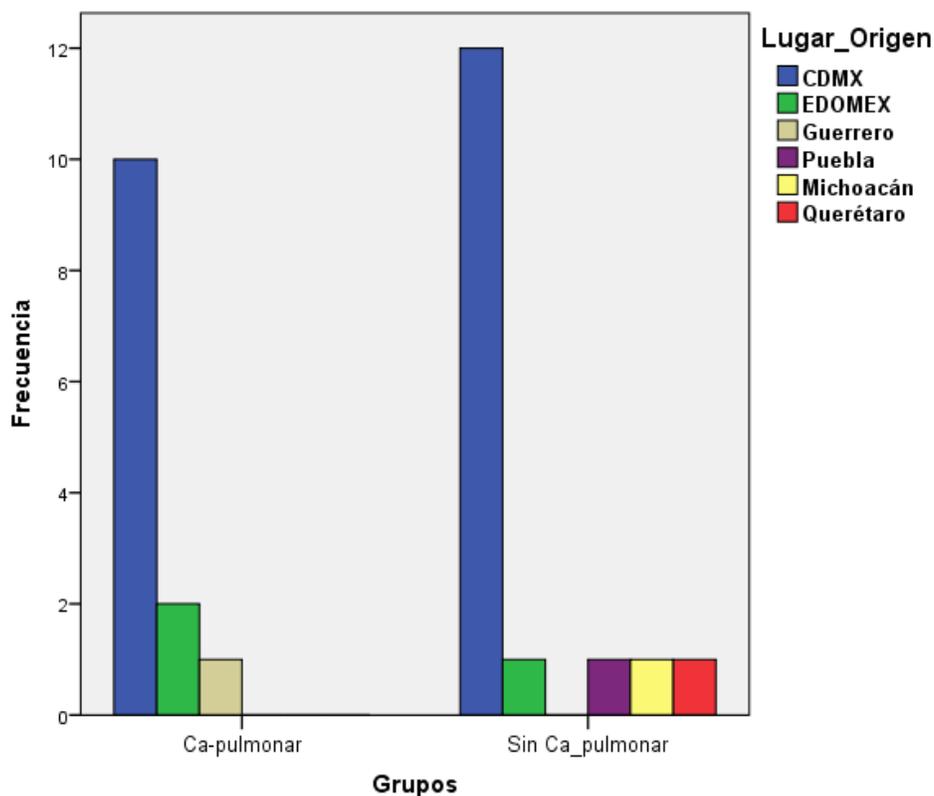
\*t Student (edad, peso), \*\*Test exacto de Fisher (Co-morbilidades, Ca\_familiar, tabaquismo, exposición a biomasa y exposición a asbesto).

Los signos y síntomas que más se asociaron a los sujetos con diagnóstico de cáncer pulmonar fueron la tos y la pérdida de peso. Y se encontró una diferencia estadística significativa para la variable pérdida de peso entre casos y controles con un valor de  $p=0.002$ . De acuerdo a la escala de valoración funcional de Karnofsky en ambos grupos, cuyo nivel de corte fue 70%, no se encontró diferencia estadística significativa. Sin embargo, de acuerdo a la valoración de la escala de ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group, *por sus siglas en inglés*) se demostró diferencia estadística significativa entre los sujetos con cáncer y los controles, con un puntaje mayor o igual a 2 por un valor de  $p=0.029$  (**tabla 8**). La Ciudad de México (CDMX) fue el lugar de origen más frecuente en la muestra estudiada con un total de 22 (75.9%) sujetos y el resto procedentes del interior del país (**figura 13**).

**Tabla 8.** Principales signos y síntomas del grupo de sujetos con cáncer pulmonar y el grupo de controles.

<b>Signos/síntomas*</b>	<b>Ca. Pulmón (n=13)</b>	<b>Controles (n=16)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
Tos	13	16	-
Fiebre	9	6	0.13
Hemoptoicos/Hemoptisis	5	3	0.4
Diaforesis	4	2	0.36
Pérdida de peso †	12	5	0.002
<b>Karnofsky ‡</b>	9	5	0.66
<b>ECOG§</b>			0.029
0	0	8	
1	5	3	
2	6	4	
3	2	1	

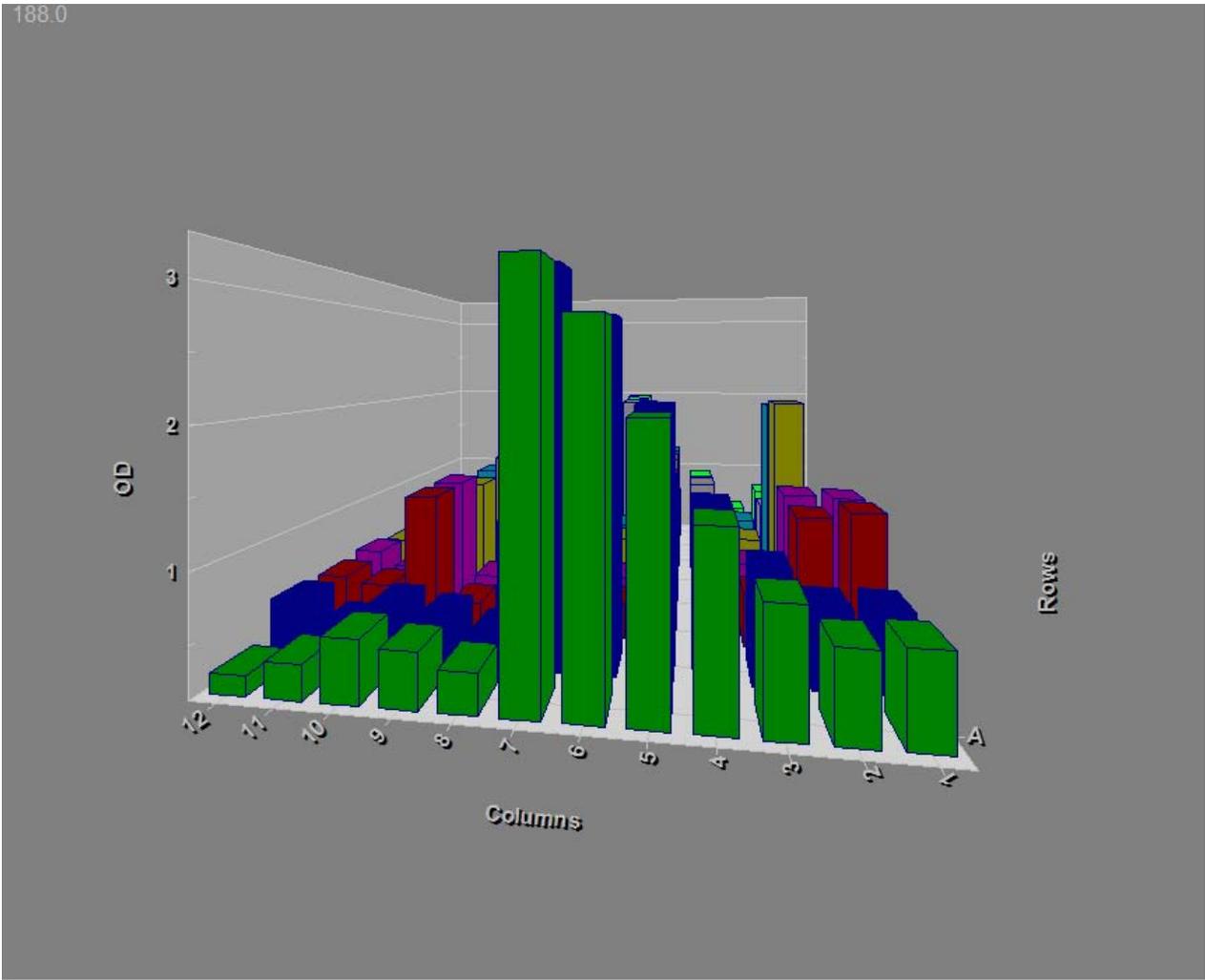
\* Análisis por Test exacto de Fisher (todas excepto la variable ECOG cuyo análisis fue mediante Ji cuadrada), † pérdida de más de 5 kg, ‡ Escala de Karnofsky menor de 70%, § ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group. Valor de  $p$  significativo si  $< 0.05$ .



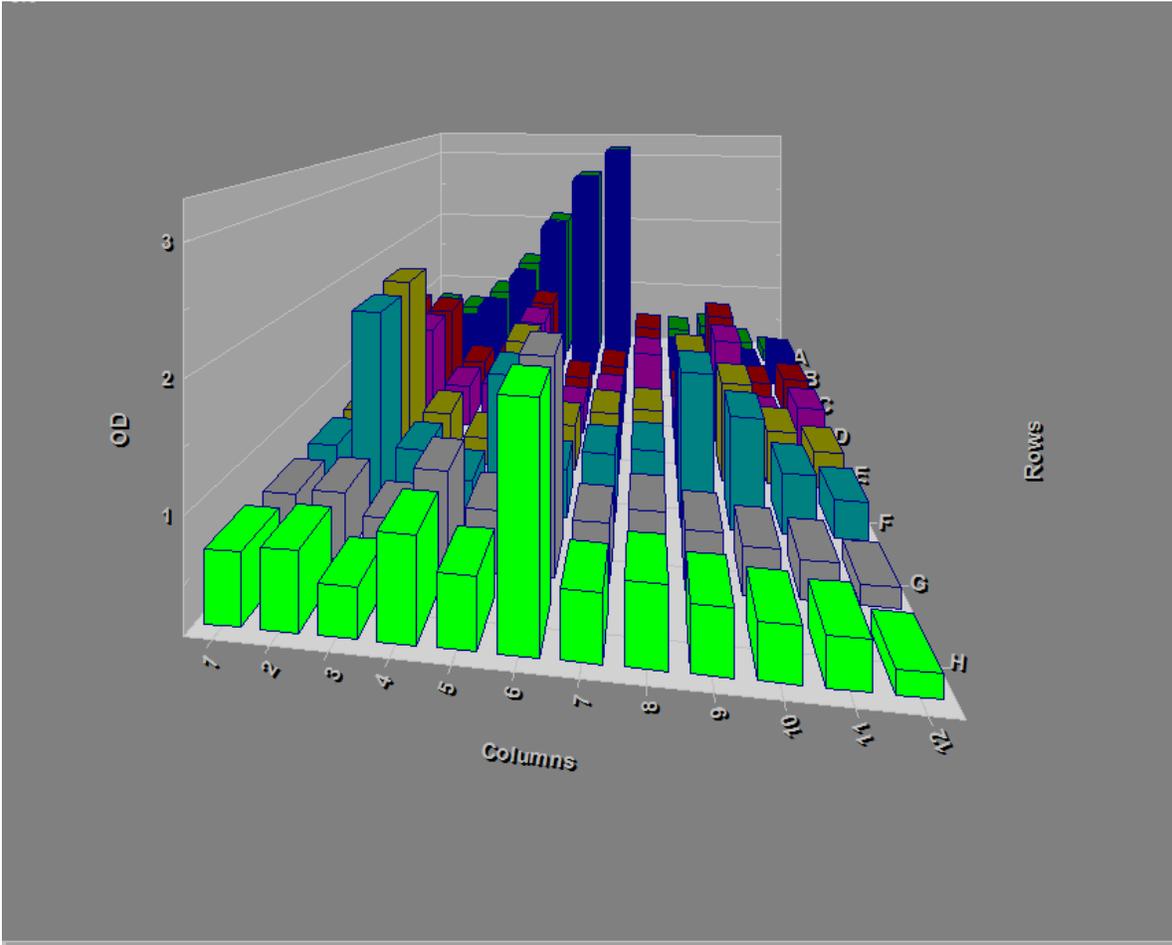
**Figura 13.** Gráfica de barras que ilustra el lugar de origen del grupo de cáncer pulmonar y sujetos sin cáncer pulmonar.

Posterior a la revisión detallada de estudios de imagen de cada sujeto con cáncer pulmonar, se clasificó a los 13 (100%) casos en estadio clínico IV, por la presencia de metástasis a distancia, dejándolos fuera de cualquier tratamiento curativo. Después de procesar las biopsias de tumor y realizar el análisis por inmunohistoquímica, la estirpe histológica que prevaleció fue adenocarcinoma pulmonar en 11 (84.6%) casos y solo dos casos reportados de carcinoma epidermoide pulmonar.

Una vez confirmado el diagnóstico en el grupo de casos, se procedió al procesamiento de las muestras de LBA, del cual se obtuvo una representación gráfica de las placas de ELISA por medio del software libre (elisaanalysis.com) y por último la cuantificación de la proteína EGFR en ambos grupos del estudio (figura 14 y 15).

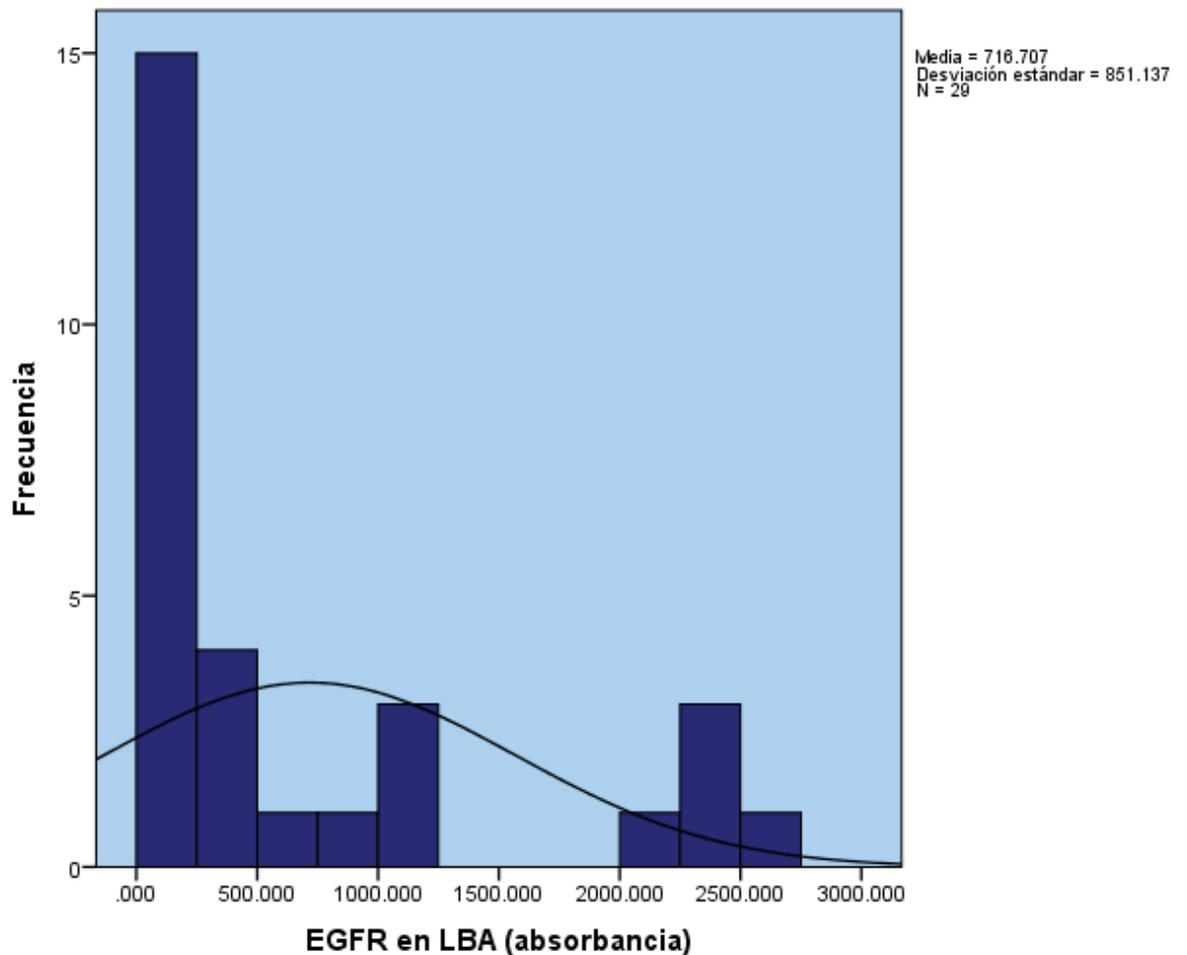


**Figura 14.** Reconstrucción tridimensional la prueba de normalización de ELISA en muestras de LBA (barras verdes) en software libre (elisaanalysis.com) para la proteína EGFR.



**Figura 15.** Reconstrucción tridimensional en software libre (elisaanalysis.com) de la lectura de cada uno de los pocillos de la placa de ELISA, para la proteína EGFR. Se observan algunas barras que a simple vista superan la media en la lectura de cada uno de los pocillos.

El resultado cuantitativo de la variable EGFR, se analizó a la par de la base de datos general en el programa IBM SPSS v. 22<sup>®</sup>. Con el objetivo de verificar supuestos de normalidad en la distribución de la variable EGFR, se realizó un histograma de frecuencias (**figura 16**) y una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, agrupada por la variable de diagnóstico definitivo (**tabla 9**).



**Figura 16.** Histograma de frecuencias que de la distribución de la variable EGFR en la muestra de sujetos estudiados. La línea curva establece la curva de normalidad hipotética esperada para esta muestra.

**Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

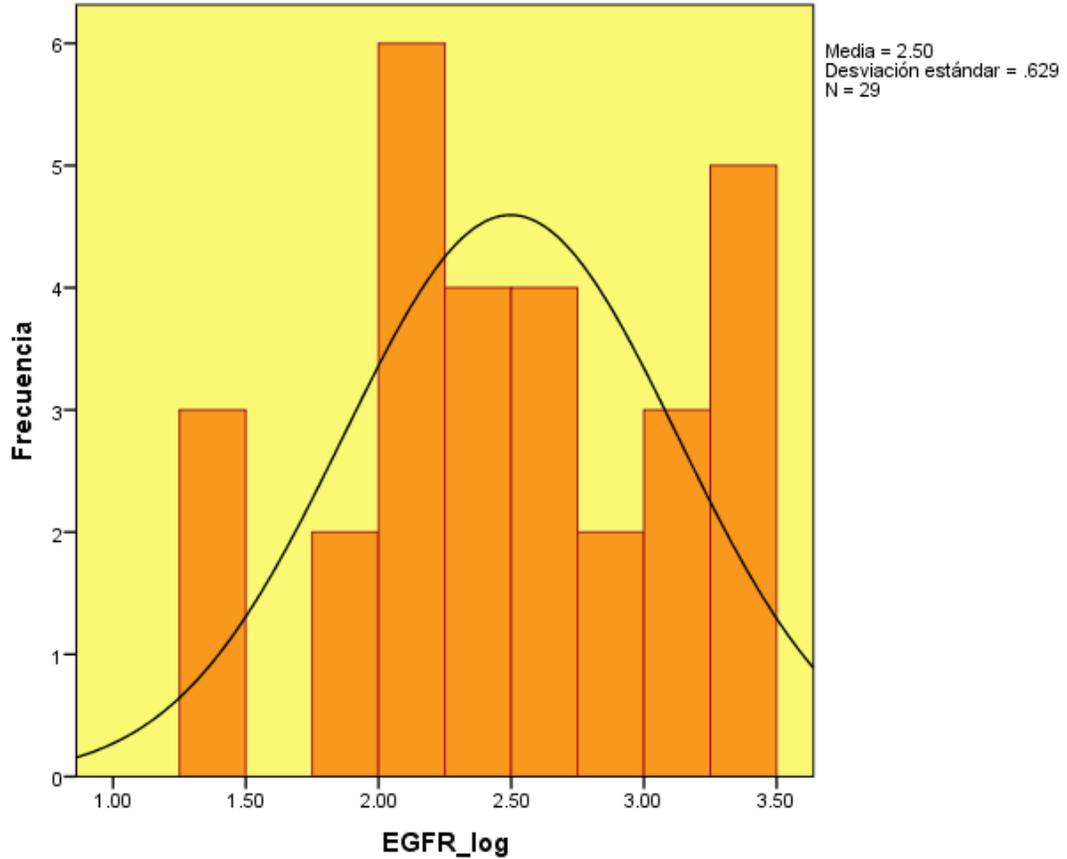
		EGFR_LBA
Máximas diferencias extremas	Absoluta	.769
	Positivo	.769
	Negativo	-.077
Z de Kolmogorov-Smirnov		2.060
Sig. asintótica (bilateral)		.000

a. Variable de agrupación: DIAGNOSTICO

Tabla 9. Prueba de Kolmogorov-Smirnov con significancia bilateral menor a 0.05, por lo que no se asume normalidad de la distribución en la variable EGFR.

A simple vista se observa en el histograma de frecuencias que no se cumplen los supuestos de normalidad, además de que la desviación estándar es mayor a la media muestral, porque es una variable con sesgo positivo (a la derecha). Al no alcanzarse estos supuestos de normalidad, se realizó una prueba de contraste de hipótesis de Kolmogorov-Smirnov. El resultado obtenido en la prueba de Kolmogorov-Smirnov fue muy significativo con un valor de  $p=0.001$ , lo que indica que no se trata de una distribución normal de la muestra. Por lo tanto, se transformó a logaritmos la variable EGFR para normalizar la curva de distribución y nuevamente se realizó el histograma de frecuencias (**figura 17**) y la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar los supuestos de normalidad (**tabla 10**).

El resultado obtenido en el histograma de frecuencias posterior a la transformación logarítmica de la variable EGFR, no logró cumplir con los supuestos de normalidad y, la distribución fue bimodal. Así mismo, el análisis realizado por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov arrojó un valor de  $p=0.0001$ , que confirma la no normalidad en la distribución de la variable cuantitativa EGFR.



**Figura 17.** Histograma de frecuencias que muestra la distribución de la variable EGFR posterior a la transformación logarítmica. La línea curva establece la curva de normalidad hipotética esperada para esta muestra.

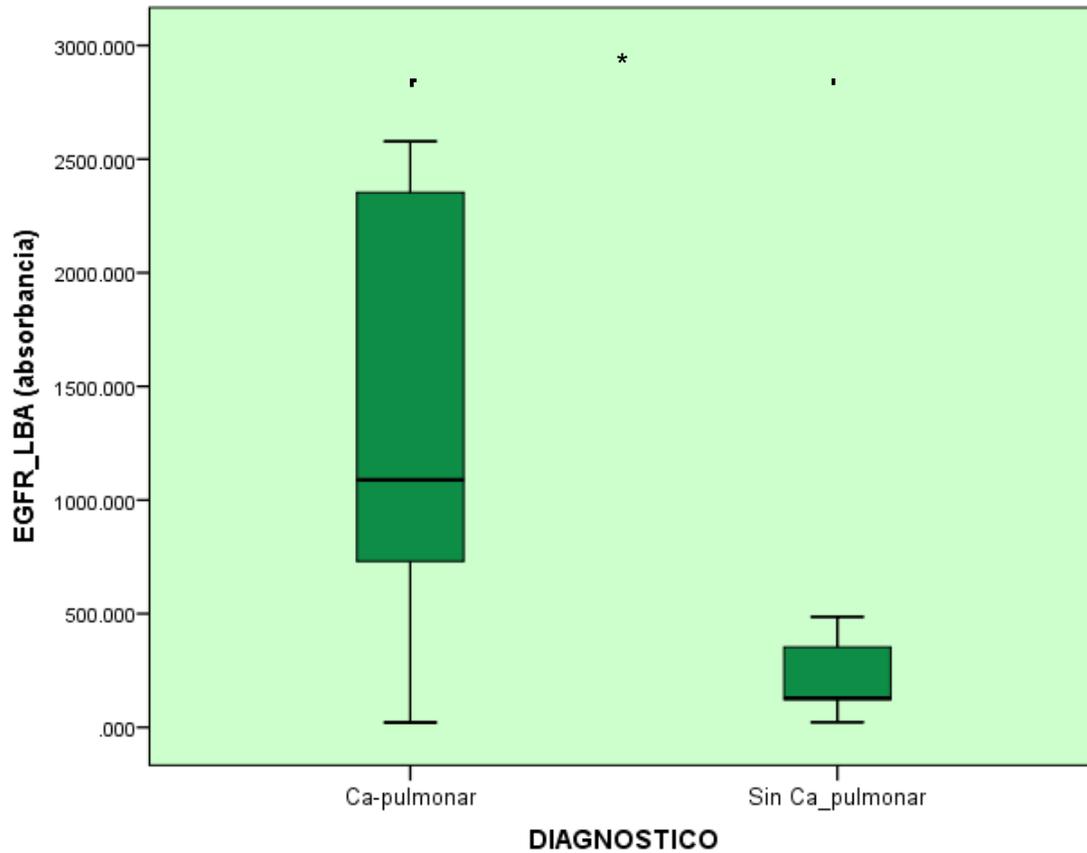
**Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

		EGFR_log
Máximas diferencias extremas	Absoluta	.769
	Positivo	.769
	Negativo	-.077
Z de Kolmogorov-Smirnov		2.060
Sig. asintótica (bilateral)		.000

a. Variable de agrupación: DIAGNOSTICO

Tabla 10. Prueba de Kolmogorov-Smirnov con significancia bilateral menor a 0.05, por lo que no se asume normalidad de la distribución en la variable EGFR después de la transformación a logaritmos.

La media de expresión de la proteína EGFR en el grupo de casos fue de  $1331 \pm$  (DE: 955.62) y para los controles fue de  $216.94 \pm$  (DE: 165.45). Previo al análisis estadístico final, se realizó una gráfica de cajas y bigotes para establecer la distribución de la variable EGFR entre ambos grupos de estudio (**figura 18**). Se observa a simple vista, la evidente diferencia de medianas entre el grupo de casos y los controles, a favor del grupo de casos.



**Figura 18.** Gráfica de cajas y bigotes que muestra la distribución de la proteína EGFR en lavado broncoalveolar entre sujetos con cáncer y sujetos sin cáncer. \* se obtuvo un valor de  $p= 0.003$  con la prueba de U de Mann-Whitney.

Se realizó el análisis no paramétrico por medio de la prueba de U de Mann-Whitney para comparar dos medianas de muestras independientes. La variable categórica fue el diagnóstico definitivo. El resultado obtenido de la comparación reportó un valor de  $p=0.003$  corregida a empates. Lo que rechaza la hipótesis nula de que no

existía diferencia de expresión de proteína EGFR en sujetos con cáncer comparado con controles sin cáncer.

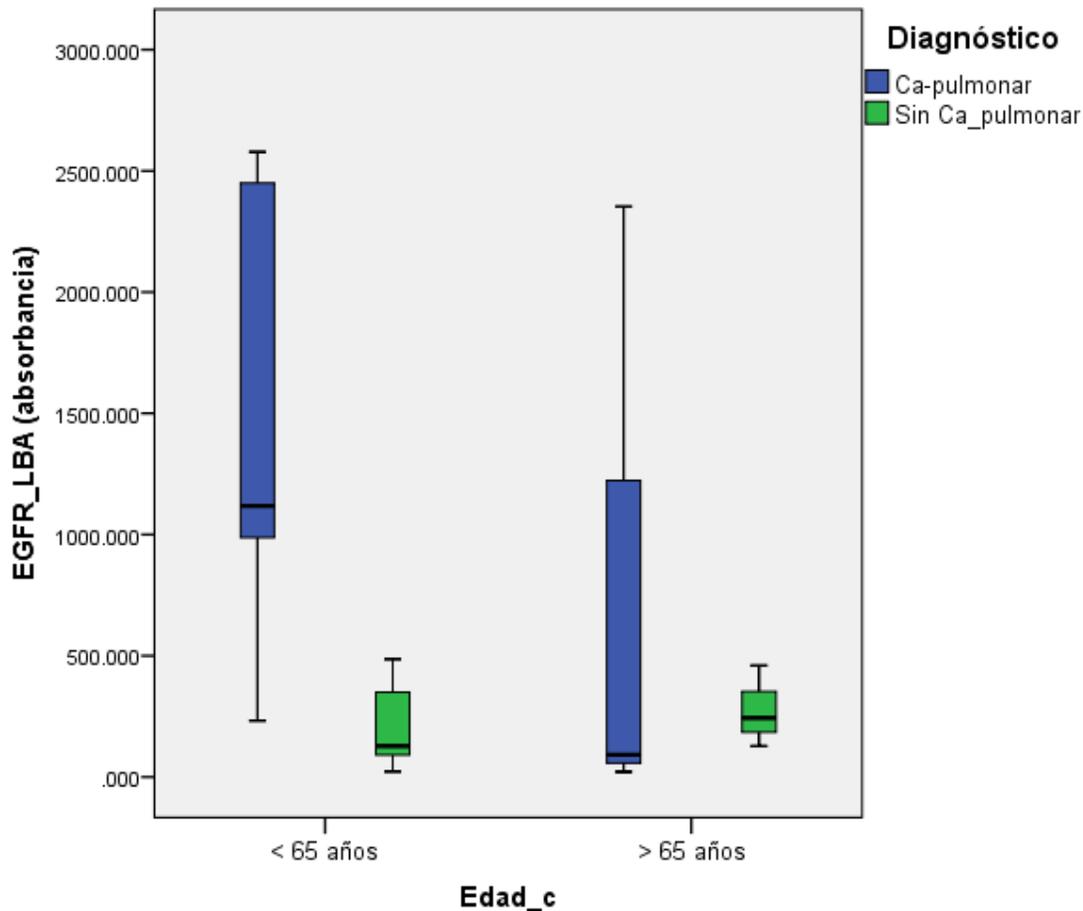
Rangos				
	DIAGNOSTICO	N	Rango promedio	Suma de rangos
EGFR_LBA	Ca-pulmonar	13	20.23	263.00
	Sin Ca_pulmonar	16	10.75	172.00
	Total	29		

Estadísticos de prueba <sup>a</sup>	
	EGFR_LBA
U de Mann-Whitney	36.000
W de Wilcoxon	172.000
Z	-2.983
Sig. asintótica (bilateral)	.003
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	.002 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: DIAGNOSTICO

b. No corregido para empates.

Tabla 11. Prueba de U de Mann-Whitney para la comparación de medianas de EGFR en muestras de lavado broncoalveolar entre el grupo de sujetos con cáncer pulmonar y controles sin cáncer. Se alcanzó significancia estadística por un valor de  $p < 0.05$ , lo que rechaza la hipótesis nula.



La distribución de la proteína EGFR entre grupos y por edad, demostró a simple vista una distribución positiva en los casos con cáncer menores y mayores de 65 años, no se realizó el análisis de medias ni medianas por el escaso número de sujetos que componen la muestra total del estudio (figura 19).

Se realizó el tamaño del efecto por medio de  $d$  de Cohen, debido a que no se completó la muestra calculada para el estudio. El valor de  $d$  de Cohen de la comparación de medias de EGFR entre los casos y los controles fue de 1.62 lo que corresponde a un tamaño del efecto moderado con un valor final de 0.63.

## 20. Discusión

El cáncer pulmonar es uno de los más mortales en todo el mundo, con una sobrevida menor a 50% a 5 años. (1, 10) La variante histológica de adenocarcinoma es la más común. El tratamiento oportuno en etapas tempranas mejora la calidad de vida y la sobrevida en los pacientes. (9) Nuevas estrategias de diagnóstico se emplean con el objetivo de captar a pacientes en etapas tempranas y mejorar esta sobrevida. Estudios moleculares y de imagen, resultan ser muy necesarios para llevar a cabo esta tarea. (7)

El principal factor de riesgo para cáncer pulmonar es el tabaquismo (49), sin embargo, en este estudio el uso de cigarrillos no se asoció a los sujetos con cáncer pulmonar cuando se comparó con los controles reportándose un valor de  $p < 0.05$ .

En el presente estudio, es un esfuerzo por continuar con la tendencia mundial hacia encontrar herramientas para complementar el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con cáncer pulmonar. Al término del mismo, se encontró una expresión diferencial estadísticamente significativa de proteína EGFR en muestras de lavado broncoalveolar de sujetos con cáncer a comparación de sujetos sin cáncer, con un tamaño del efecto mayor al proporcionado por el azar.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, por sus siglas en inglés), se asocia a la carcinogénesis. La mutación de EFGR es específica de adenocarcinoma y su presencia se asocia con enfermedad avanzada, (27) y actualmente es muy necesaria su detección antes del inicio de tratamiento en pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Esto con la finalidad de mejorar el pronóstico y la sobrevida de los pacientes con cáncer como lo demostró Jett *et al.*(11).

Similar a lo reportado por Saleh *et al.*, (28) existe una expresión diferencial de proteínas en muestras de lavado broncoalveolar en pacientes con cáncer pulmonar. A diferencia de Saleh *et al.*,(28) en este estudio se incluyeron pacientes con otras variedades histológicas de cáncer pulmonar, pero en etapa clínica mayor a la

reportada por Saleh et al, demostrando que la expresión pudiera ser similar en variantes histológicas diferentes pero con etapa clínica avanzada.

Esta expresión aumentada de proteínas en sujetos del estudio, puede ser secundaria a la etapa clínica avanzada al momento de la inclusión en el estudio. Siendo necesario continuar con el mismo con fines de estratificación por etapa clínica y comparación entre grupos. Desafortunadamente, el diagnóstico de cáncer pulmonar solo se sospecha cuando existe presencia de síntomas respiratorios asociados, lo que limita en gran medida la posibilidad de diagnóstico temprano ya que la presencia de síntomas en cáncer se asocia a etapas clínicas avanzadas. (8)

El siguiente resulta ser un estudio piloto en México para incursionar en el análisis proteico en muestras de lavado broncoalveolar. Sin embargo, es necesario complementar la muestra con una mayor cantidad de sujetos que permita realizar una estratificación para comparaciones por etapa clínica de la enfermedad. De igual forma, la determinación de mutaciones propias de proteínas en material obtenido con este método, con objetivo de minimizar la necesidad de biopsias pulmonares en pacientes con alta sospecha de cáncer pulmonar por datos clínicos y de imagen.

## **21. Conclusiones**

La expresión de proteínas se encuentra sobre-expresada en sujetos con cáncer pulmonar en etapa clínica avanzada, cuando se realizó la comparación de medias de EGFR en sujetos sin cáncer pulmonar, encontrándose un tamaño del efecto moderado-alto.

## 22. Referencias

1. World Health Organization. Globocan 2012. [Online].; 2012 [cited 2015 Septiembre 6. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
2. Franco Marina F, Villalba Caloca J. La epidemia de cáncer pulmonar en México. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2001 Octubre-diciembre; 14(4): p. 207-214.
3. AG, O MF, AU. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. Nat Rev. 2004; 4: p. 361-370.
4. J. Alberg , V. Brock , G. Ford , M. Samet , D. Spivack. Epidemiology of Lung Cancer Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. CHEST. 2013 Mayo; 143(5): p. e1S-e29S.
5. Ozlü T, Bülbül Y. Smoking and lung cancer. Tuberk Toraks. 2005; 53(2): p. 200-209.
6. García-Sancho Figueroa , Fernández Plata R, Rivera de la Garza MS, Mora Pizano MdlÁ, Martínez Briseño D, Franco Marina F, et al. Humo de leña como factor de riesgo de cáncer pulmonar. Neumol Cir Torax. 2012; 71(4): p. 325-332.
7. G. Yanbaeva , A. Dentener , C. Creutzberg , Wesseling G, F. M. Wouters. Systemic Effects of Smoking. CHEST. 2007 Mayo; 131(5): p. 1557–1566.
8. Moreno AKM, Rodríguez B, Fuentes M. Mujeres y el cáncer de pulmón. Neumol Cir Torax. 2013 Jul-Sep; 3: p. 229-240.
9. Consenso Nacional de Expertos. Guías Mexicanas para el Tratamiento del Tabaquismo. Neum Cir Tor. 2005; 64(S2): p. S83-S112.
10. Hecht S. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. J Natl Cancer Inst. 1999; 91: p. 1194–1210.
11. De la Cruz S, Tanoue T, Matthay A. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clin Chest Med. 2011; 32: p. 605-644.
12. Takei K, MM, C. Asbestos Induces Reduction of Tumor Immunity. Clinical and Developmental Immunology. 2011;; p. 1-9.
13. C. Detterbeck , E. Postmus P, T. Tanoue. The Stage Classification of Lung Cancer Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. CHEST. 2013 Mayo; 143(5): p. e191S–e210S.
14. A. Silvestri , V. Gonzalez , A. Jantz , L. Margolis , K. Gould , T. Tanoue , et al. Methods for Staging Non-small Cell Lung Cancer Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. CHEST. 2013 Mayo; 143(5): p. e211S–e250S.
15. Echegoyen Carmona , Camacho Mendoza. Calidad de vida y cáncer pulmonar. Neumol Cir Torax. 2011 Jul-Sep; 70(3): p. 172-178.
16. R Melamed M, J Flehinger B, B Zaman M, T Heelan R, A Perchick W, Martini N. Screening for Early Lung Cancer. CHEST. 1984 Enero; 86(1): p. 44-53.

17. Tockman M. Survival and mortality from lung cancer in a screened population: the Johns Hopkins study. *Chest*. 1986; 89((suppl)): p. 324S-325S.
18. L Humphrey L, Teutsch S, Johnson M. Lung Cancer Screening with Sputum Cytologic Examination, Chest Radiography, and Computed Tomography: An Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2004; 140: p. 740-753.
19. Velasco CR, Zarco. Cáncer de pulmón. *Anales de Radiología México*. 2009; 1: p. 33-45.
20. Alpert B, Naidich P. Imaging of Incidental Findings on Thoracic Computed Tomography. *Radiol Clin N Am*. 2011; 49: p. 267-289.
21. C Detterbeck F, J Mazzone P, P Naidich D, B Bach P. Screening for Lung Cancer. *Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. *Chest*. 2013; 143((5)(Suppl)): p. e78S-e92S.
22. Team TNLSTR. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med*. 2011; 365(395-409).
23. J Van Klaveren R, Oudkerk M, Prokop , T Scholten E, Nackaerts , Vernhout R, et al. Management of Lung Nodules Detected by Volume CT Scanning. *N Engl J Med*. 2009; 361: p. 2221-2229.
24. A Randomized Study of Lung Cancer Screening with Spiral Computed Tomography. Three-year Results from the DANTE Trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180: p. 445-453.
25. A, M, Hicks J. Lung Cancer. *PET Clin*. 2015; 10: p. 147-158.
26. F Casal R, E Ost D, A Eapen. Flexible Bronchoscopy. *Clin Chest Med*. 2013; 34: p. 341-352.
27. F Herth FJ. Bronchoscopic techniques in diagnosis and staging of lung cancer. *Breathe*. 2011; 7(4): p. 325-337.
28. Carmona E, Mendoza. Calidad de vida y cáncer pulmonar. *Neumol Cir Torax*. 2011 Jul-Sep; 70(3): p. 172-178.
29. Ramnath N, J. Dilling , J. Harris , W. Kim , C. Michaud , A. Balekian , et al. Treatment of Stage III Non-small Cell Lung Cancer *Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. *CHEST*. 2013 Mayo; 143(5): p. e314S–e340S.
30. A. Socinski , Evans , Gettinger , A. Hensing , VanDam Sequist , Ireland , et al. Treatment of Stage IV Non-small Cell Lung Cancer *Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. *CHEST*. 2013 Mayo; 143(5): p. e341S–e368S.
31. Gadgee M, Ramalingam S, Kalemkeria GP. Treatment of Lung Cancer. *Radiol Clin N Am*. 2012; 50: p. 961-974.
32. R. Jett , L. Carr. Targeted Therapy for Non–Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Oct; 188(8): p. 907–912.
33. Wilkins M. Proteomics data mining. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6(6): p. 599-603.

34. J Geisow. Proteomics: One small step for a digital computer, one giant leap for humankind. *Nature Biotechnology*. 1998; 16: p. 206.
35. Müllner S, Neumann T, Lottspeich F. Proteomics-a new way for drug target discovery. *Arzneimittelforschung*. 1998; 48(1): p. 93-95.
36. Wang C, Xiao Q, Li Y, Zhao C, Jia N, Li R, et al. Regulatory mechanism of annexin-induced chemotherapy resistance in cisplatin resistant lung adenocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(7): p. 3191-3194.
37. Hirsch J, C Hansen K, L Burlingame A, A Matthay M. Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 287: p. L1-L23.
38. Moreno F, U, Quintero O. MicroRNAs en el diagnóstico y prognosis del cáncer pulmonar. *Revista de Investigación Clínica*. 2011 Sep-Oct; 63(5): p. 516-535.
39. Linardou , J Dahabreh I, Bafaloukos D, Kosmidis , Murray. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6: p. 352-366.
40. Carreon OZ, Mendiola AV, Steider BW, Cruz IS. EL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 2012; 15(1): p. 15-25.
41. ES, RT. Atomistic insights into regulatory mechanisms of the HER2 tyrosine kinase domain: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal*. 2009; 96: p. 2321-2334.
42. R IN, J MG, M EH. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001; 37(2): p. S9-S15.
43. NICE. EGFR-TK mutation testing in adults with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. NICE. 2013;; p. 1-46.
44. A AS, McDonald CF. Quantitative Proteomics of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Lung Adenocarcinoma. *CANCER GENOMICS & PROTEOMIC*. 2015; 12: p. 39-48.
45. S, JB. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(18): p. 5268-5272.
46. O. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*. 2005; 25(1): p. 1-7.
47. Vázquez G. Las pruebas de Elisa. *Gac Méd Méx*. 2004; 140(3): p. S48-S49.
48. Yuil JM, Pérez , de Ríos. ELISA y sus aplicaciones en dermatología. *Dermatología CMQ*. 2012; 10(3): p. 212-222.
49. Schwartz G. Genetic Epidemiology of Cigarette Smoke–Induced Lung Disease. *Am Thorac Soc*. 2012; 9(2): p. 22-26.
50. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduce Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomography Screening. *N Engl J Med*. 2011; 365: p. 395-409.
51. Edward F PJ, J Campa , B Gottlin , Kusmartseva , Rong Guan , E Herndon II. Panel of Serum Biomarkers for the Diagnosis of Lung Cancer. *Journal of Clin Onc*. 2007; 25(35): p. 5578-5583.

52. Vaksman , Davidson , Tropé , Reich. Calreticulin expression is reduced in high-grade ovarian serous carcinoma effusions compared with primary tumors and solid metastases. *Human Pathology*. 2013 Noviembre; 44(12): p. 2677–2683.
53. Biauxue , Jiang , Yang , Zhang W, Cai X, Wang J, et al. Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2012; 31(70): p. 1-14.
54. Raghavan , J Wijeyesakere , Robert Peters , Del Cid. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends in Immunology*. 2013; 34(1): p. 13-21.
55. Yan L, Ye Z, Jie M, Li-Li L, Ning-Qiang M, Ying-Ming F, et al. Calcineurin promotes proliferation, migration, and invasion of small cell lung cancer. *Tumor Biol*. 2010; 31: p. 199-207.
56. Mancini M, Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: p. 810-820.
57. Sung Min K, Hye Jin S, Jung Mo A, Jae Yong P, Soo Youn L, Choon Sik P, et al. The Haptoglobina B chain as a supportive biomarker for human lung cancers. *Mol ByoSyst*. 2011; 7: p. 1167-1175.

## 23. Anexos

### 23.1. Anexo 1.



#### **Identificación de proteína EGFR en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar.**

Investigador Responsable: Dr. Baltazar Pech Alonso

Investigador Titular: Dr. Raúl Cicero Sabido y Dra. Gabriela Mercado Celis.

#### ***INVITACIÓN A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO***

Estimado Sr. (a) \_\_\_\_\_

Se le hace una cordial petición para participar en el presente estudio sobre cáncer de pulmón. En este estudio se compararán cuatro grupos de pacientes mayores de 18 años:

- a) No fumadores con cáncer de pulmón
- b) No fumadores sin cáncer de pulmón
- c) Fumadores con cáncer de pulmón
- d) Fumadores sin cáncer de pulmón

Se le ha seleccionado para participar en este estudio porque cumple con las características requeridas para alguno de estos grupos. El objetivo del estudio es analizar el lavado broncoalveolar de personas fumadoras con y sin cáncer de pulmón para conocer si existen proteínas que solo están presentes en el lavado

brocoalveolar de aquellas personas que tienen cáncer de pulmón. Las proteínas son como pequeñas maquinas que ayudan a las células y al cuerpo a funcionar. Las células cancerosas contienen proteínas únicas que las ayudan a sobrevivir. Algunas de estas proteínas de cáncer salen de las células y pueden ser detectadas en sangre o como esperamos en este estudio, en lavado broncoalveolar. En caso de encontrar algunas de estas proteínas en lavado broncoalveolar, podrían en un futuro ayudarnos a diagnosticar tempranamente a los pacientes de cáncer de pulmón.

Su participación en el estudio no implica que tenga que cambiar como paciente su esquema de medicamentos ni ningún otro tipo de tratamiento.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios con el fin tomar una decisión informada. Este formato de consentimiento informado le dará información detallada acerca del estudio de investigación y un miembro del equipo de investigadores lo discutirá con usted. Le informaremos de todos los aspectos de esta investigación incluyendo sus objetivos, los posibles beneficios y riesgos que tendrá si decide participar. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, firmará la carta de consentimiento informado.

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este formato, pregunte y hable de este proyecto a familiares, amigos y también si prefiere a su médico de confianza.

### ***PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO***

Este estudio tiene varias partes, se pretende que se realicen todas en una sola entrevista para que sea más cómodo para usted:

- 1) Obtendremos una muestra de lavado broncoalveolar. La cual se toma al momento de realizar el estudio de videobroncoscopía, antes de la toma se le explicará el procedimiento y se aplicará anestesia local en nariz y boca, solo en caso necesario se procederá a administrar algún anestésico por vía intravenosa, siendo el caso será vigilado por el servicio de anestesiología.

La recolección de lavado broncoalveolar consiste en introducir el broncoscopio (previa anestesia) por nariz o boca y se instilará no más de 120 ml de solución salina estéril en fracciones de 20 ml. Posteriormente se aplicará succión gentil a travez del broncoscopio hasta obtener una muestra mínima de 30 ml la cual se conservará en refrigeración a -80°C.

La muestra se tomará cuándo se le practique la broncoscopía que es parte del protocolo para el estudio de su enfermedad y este procedimiento tarda alrededor de 20 min.

- 2) Le solicitaremos información acerca de sus antecedentes médicos y estado de salud a través de un cuestionario.

1. Obtendremos datos sobre sus antecedentes familiares, historia médica. Se realizará una entrevista y se tomarán datos contenidos en su expediente clínico.
2. El tiempo requerido para llenar el cuestionario es de 20 minutos

## **RESULTADOS DEL ESTUDIO**

Es importante señalar que estos estudios son realizados como investigación y que no ofrecen mejoría en el diagnóstico en el corto o mediano plazo.

En este estudio las muestras de lavado broncoalveolar de los participantes de cada uno de los cuatro grupos se combinarán para encontrar si existen proteínas que solo estén presentes en el grupo de cáncer. Por lo tanto, no podremos saber los resultados de su muestra en particular. Consecuentemente, no se podrá dar ningún resultado en cuanto al diagnóstico de cáncer de pulmón de cada participante.

## **RIESGOS E INCONVENIENTES**

Los **riesgos más graves** para el procedimiento broncoscópico son:

1. Sangrado
2. Arritmias cardiacas
3. Convulsiones
4. Infartos cardiacos/edema pulmonar
5. Neumotórax
6. Sobresedación que requiera de manejo con ventilación mecánica
7. Hospitalización
8. Admisión a la unidad de cuidados intensivos
9. Muerte

Es importante hacer de su conocimiento que solamente 1 de cada 100 pacientes en quienes se realiza este procedimiento presenta alguna de las complicaciones antes mencionadas.

## ***BENEFICIOS PARA USTED***

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente en el corto plazo. Sin embargo, la identificación de biomarcadores (proteínas) de cáncer de pulmón en lavado broncoalveolar puede ayudar en un futuro a diagnosticar tempranamente a personas con riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, además gracias a su participación, su comunidad se puede beneficiar significativamente al mejorar el gasto que se destina a la atención de esta enfermedad y sus complicaciones.

## ***CONSIDERACIONES ECONÓMICAS***

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

## ***CONFIDENCIALIDAD***

Su nombre no será usado en ninguna de las pruebas genómicas, la muestra de lavado broncoalveolar no contendrá ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. En el curso de la prueba su muestra no podrá serle devuelta. Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave en una oficina del Hospital General de México bajo estrictas medidas de seguridad en donde solo parte de los investigadores tendrán acceso. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

(Si es el caso)

Las Comisiones de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” (comisiones que revisan, aprueban y monitorean los estudios de investigación) podrán revisar los datos del estudio, cabe mencionar que

sus integrantes cuentan con un convenio de confidencialidad por lo que no pueden revelar sus datos.

En el futuro, si identificamos información que creamos es importante para su salud, consultaremos con la Comisión de Ética que supervisará este estudio para que decidamos la mejor forma de dar esta información a usted y a su médico.

### ***EN CASO DE LESIONES***

La toma de muestras de lavado broncoalveolar tiene los riesgos antes citados, si sufriera lesiones como resultado de su participación en este estudio, nosotros le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, en caso de ameritarlo, al especialista médico que requiera. No contamos con presupuesto para financiar compensaciones por lesiones.

### ***DERECHO A ABANDONAR EL ESTUDIO***

Usted es libre de decidir si participa o no en este estudio de investigación. Si decide participar, puede cambiar de opinión y retirarse del estudio en el momento que lo decida. Si decide no participar, o si se retira, no afectará su relación con sus médicos tratantes en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. La muestra de lavado broncoalveolar será destruida si usted se retira.

### ***PREGUNTAS***

Fue necesario utilizar lenguaje técnico en este formato de consentimiento informado. Por favor, solicite que le expliquen cualquier cosa que no entienda y contestaremos todas sus preguntas. Si tiene preguntas en el futuro acerca de este proyecto o si tiene problemas relacionados con el estudio, puede contactar con el

investigador a cargo, Dr. Baltazar Pech Alonso al telefono 55 27 27 85 46. Si tiene dudas acerca de sus derechos como participante del estudio, puede contactar a la Comisión de Ética del Hospital general de México “Dr. Eduardo Liceaga”

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES

México, D.F., a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Por medio de la presente hago constar que \_\_\_\_\_ por mi propio derecho, estoy de acuerdo en participar en el proyecto de investigación "Identificación de proteína (EGFR) en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar."

Estoy enterado de que mi participación en el estudio consistirá únicamente en donar una muestra de lavado broncoalveolar obtenido por fibrobroncoscopia.

Se me ha explicado que la toma de muestra de lavado broncoalveolar implica la realización de estudio broncoscópico y que las complicaciones secundarias a este procedimiento son: falta de aire, tos, expectoración con sangre, infección pulmonar, espasmo bronquial y paro respiratorio. Asimismo, estoy enterado que la información obtenida del estudio es absolutamente confidencial y que esta información será manejada únicamente por los investigadores y sólo será utilizada para conocer los antecedentes. Estoy consciente de que mi participación en el estudio es completamente voluntaria, que participar no implica pago o retribución alguna y que, si en medio del proceso decido no continuar, toda la información recopilada será eliminada.

He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Atentamente

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo  
Dirección

He entregado la información precisa y necesaria sobre los objetivos del proyecto, riesgos, beneficios y derechos que tiene cada participante. Declaro que su decisión de participar en el estudio ha sido tomada de manera libre, sin presiones o influencias de ningún tipo y soy testigo de que esta carta ha sido firmada por el participante arriba mencionado.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del investigador (No. telefónico)

23.2. Anexo 2.

**Hoja de Recolección de Datos**  
**Identificación de proteína (EGFR) en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con**  
**diagnóstico de cáncer pulmonar.**

Fecha: \_\_\_\_\_

Día / Mes / Año

**Datos de Identificación del participante:**

Nombre: \_\_\_\_\_

Paterno                      Materno                      Nombres

Expediente: \_\_\_\_\_

Edad (años): \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

Día / Mes / Año

Lugar de origen: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Sexo:

1 Hombre

2 Mujer

Grado máximo de estudios:

1 Ninguna

2 Primaria

3 Secundaria

4 Preparatoria

5 Profesional

6 Postgrado

Peso (kg): \_\_\_\_\_ Peso perdido: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

**Antecedentes Heredo-Familiares:**

Cáncer de pulmón en algún miembro de la familia

**Antecedentes Patológicos:**

1 Cardiovascular: 1 si 2 no

Especificar: \_\_\_\_\_

2 Respiratorio: 1 si 2 no

Especificar: \_\_\_\_\_

3 Gastrointestinal: 1 si 2 no

Especificar: \_\_\_\_\_

4 Neurológico: 1 si 2 no

Especificar: \_\_\_\_\_

5 Cáncer: 1 si 2 no

Especificar: \_\_\_\_\_

6 Músculoesquelético: 1 si 2 no

Especificar: \_\_\_\_\_

7 Medicamentos utilizados actualmente:

Nombre	Dosis	Frecuencia	Ultima dosis (Hora)

**Antecedentes Tabaquismo:**

Edad de inicio (años):

Numero de cigarros por día:

Marca de cigarros:

Número de años:

Numero de intentos para dejar de fumar:

Hace cuánto tiempo dejo de fumar:

**Historia Ocupacional (ATS-DLD-78):**

Trabajo por un año o más en un lugar con polvo:

- 1 Si
- 2 No

Especifique trabajo o industria: \_\_\_\_\_

Exposición al polvo: 1 Leve 2 Moderada 3 Severa

Exposición con gas o vapores químicos:

- 3 Si
- 4 No

Especifique trabajo o industria: \_\_\_\_\_

Exposición al polvo: 1 Leve 2 Moderada 3 Severa

Ocupación o trabajo en que duro más tiempo: \_\_\_\_\_

Ocupación o trabajo: \_\_\_\_\_

Numero años que trabajo en este lugar: \_\_\_\_\_

Posición: \_\_\_\_\_

Tipo de negocio o industria: \_\_\_\_\_

Exposición a asbesto: \_\_\_\_\_

Tipo de exposición: 1 Laboral 2 Doméstica

Tiempo de exposición: \_\_\_\_\_

Exposición a humo de leña: \_\_\_\_\_

Tipo de exposición: 1 Laboral 2 Doméstica

Tiempo de exposición: Años \_\_\_\_\_ Horas: \_\_\_\_\_ IB: \_\_\_\_\_

**Exposición a alguno de los siguientes químicos:**

Radón

Cadmio

Cromo

Berilio

Aluminio

Silica

Ácido sulfúrico

Bis cloro-metil-eter y cloro-metil-eter

Coca

Gas mostaza

**Trabajo involucrado con alguno de estos procesos:**

Fundición del arsénico

Gasificación del carbón

Hundimiento de hierro o acero

**Estudios realizados en el último año:**

1 Radiografía de Tórax:

i. Fecha:

ii. Resultado:

2 Tomografía computada Tórax:

i. Fecha

ii. Resultado

**Enfermedad Actual (Solo para pacientes con Diagnostico confirmado de Adenocarcinoma)**

Fecha de inicio de la sintomatología:

Fecha del diagnóstico:

ECOG/Karnofsky:

Principales síntomas clínicos de inicio:

**Estadio de la enfermedad:**

1 I A

2 I B

3 II A

4 II B

5 III A

6 III B

7 IV

8 No estadificado